



Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Medicina  
Departamento de Anatomía Patológica

**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES RELACIONADOS  
CON LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA Y  
CARACTERIZACIÓN DE MODELOS CELULARES  
TRIDIMENSIONALES *IN VITRO* EN CÁNCER DE OVARIO  
AVANZADO.**

**TESIS DOCTORAL**

**VICTORIA HEREDIA SOTO**

**Madrid, 2016**



Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Medicina  
Departamento de Anatomía Patológica

Don DAVID HARDISSON HERNÁEZ, Profesor Titular de Anatomía Patológica, Director del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz,

Doña MARTA MENDIOLA SABIO, Doctora en Bioquímica e investigadora del Instituto de Investigación del Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ

**CERTIFICAN**

Que Doña VICTORIA HEREDIA SOTO, Licenciada en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado **“IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS CELULARES TRIDIMENSIONALES *IN VITRO* EN CÁNCER DE OVARIO AVANZADO”** que cumple, a nuestro juicio, con los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Para que así conste donde proceda, firmamos el presente escrito en Madrid, a 6 de octubre de 2016.

David Hardisson Hernáez

Marta Mendiola Sabio

Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

(Marie Curie)

## AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, con su apoyo, han colaborado en la realización de este trabajo.

En primer lugar, me gustaría agradecer al Doctor David Hardisson la confianza depositada en mí y el haberme elegido para formar parte de su equipo y poder realizar este trabajo. Por sus conocimientos, por su visión crítica y constructiva, y por los comentarios y sugerencias sin los cuales la realización de este trabajo no habría sido posible.

A la Doctora Marta Mendiola. No existen palabras para agradecerte todo lo que me has enseñado a lo largo de estos cinco años, no sólo a nivel profesional, sino también a nivel personal. Gracias por tu orientación, tu persistencia, tu paciencia y, sobre todo, por tu entusiasmo y tu optimismo infinito. Tienes toda mi admiración y me siento orgullosa de poder llamarte amiga.

A María Miguel, Esther Díaz y Roberto Crespo. Por ser los mejores compañeros de trabajo, por ayudarme en todo cada día y “enmarronaros” constantemente con mis experimentos imposibles, y por hacerme llegar al trabajo con una sonrisa cada mañana. Gracias por vuestra dedicación, porque sin vosotros este trabajo no habría salido adelante.

Al Doctor Andrés Redondo, por sus consejos relacionados con el tratamiento del cáncer de ovario y por contribuir en mi formación en la investigación clínica.

Al Doctor Alberto Berjón, por su ayuda en la selección de los casos y en la valoración de la inmunohistoquímica.

A los Doctores Stefan Walter y Ruth Gil, por descubrirme un nuevo mundo en el campo de la estadística y dar sentido a los resultados de este trabajo.

A la Doctora Virginia Martínez, por amenizar mis comidas, por apoyarme en todo momento y no dejarme caer en la desesperación en los momentos más complicados.

A Raquel del Amo, por ser mi primera compañera de fatigas al llegar al laboratorio. Empezar mi carrera investigadora contigo hizo todo el proceso mucho más fácil y me dejaste las bases para empezar este proyecto.

A todas las pacientes, que han cedido de manera altruista las muestras del estudio y que han aportado su granito de arena para ayudarnos a comprender un poco mejor la complejidad de esta enfermedad.

A mis padres, por haberme proporcionado la mejor educación y lecciones de vida y por haberme enseñado que con esfuerzo, trabajo y constancia todo se consigue. Gracias por

confiar en mí y en mis expectativas y por vuestro apoyo incondicional en los buenos y los malos momentos.

A mi hermana, a mis abuelas y a Mus, por su cariño, por cuidarme y estar siempre a mi lado.

A mis amigos, especialmente al “Pack”, por haber estado ahí siempre que os he necesitado, por aguantar mis charlas sin entender ni una palabra de los que os estaba contando, y por animarme cada día.

Y gracias a Borja, por estar presente no sólo en esta etapa tan importante de mi vida sino en todo momento, ofreciéndome lo mejor, ayudándome a ser mejor persona, soportándome cada día y queriéndome mucho.

Este trabajo ha sido realizado en los laboratorios de Oncología Traslacional y Patología Molecular y Dianas Terapéuticas del Instituto de Investigación del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), con financiación del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III (Ayudas Predoctorales de Formación en Investigación en Salud, expediente FI11/00538) y de la Fundación Mutua Madrileña.

## ÍNDICE

# Contenido

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
1. CÁNCER DE OVARIO	2
1.1 Epidemiología	2
1.2 Factores de riesgo	2
1.3 Etiopatogenia	3
1.4 Clasificación del cáncer de ovario	4
1.5 Estadificación del cáncer de ovario	8
1.6 Historia natural y diagnóstico del cáncer de ovario	8
1.7 Tratamiento del cáncer de ovario	10
1.7.1 Primera línea de tratamiento	10
1.7.2 Tratamiento a la recaída	10
1.7.3 Terapias dirigidas	11
1.8 Factores pronósticos y predictivos de respuesta	12
1.8.1 Factores clínico-patológicos	12
1.8.2 Factores moleculares	13
2. TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA	15
2.1 Concepto de Transición Epitelio-Mesénquima (TEM)	15
2.2 TEM y su papel en la progresión tumoral	16
2.3 Mecanismos moleculares de la TEM	18
2.3.1 Reguladores de la TEM	19
2.3.2 Regulación de la Cadherina E	19
2.3.3 Inductores de la TEM y vías de señalización	20
3. MODELOS PARA EL ESTUDIO DE CÁNCER DE OVARIO	24
3.1 Modelos <i>in vitro</i>	24
3.1.1 Cultivo primario vs. líneas establecidas	24
3.1.2 Análisis <i>in vitro</i> de proliferación, apoptosis, ciclo celular, migración e invasión.	25
3.1.3 Cultivo en 3D.	27
3.2 Modelos <i>in vivo</i>	30
<b>II. HIPÓTESIS y OBJETIVOS</b>	32
1. HIPÓTESIS	33
2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo primario	34
2.2 Objetivos secundarios	34
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	35
1. PACIENTES Y VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS	36



2. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA .....	37
2.1 Selección de genes .....	37
2.2 Procesamiento de las muestras .....	38
2.2.1 Aislamiento de ARN total. ....	39
2.2.2 Síntesis del ADNc. ....	39
2.2.3 Análisis de la expresión génica. ....	39
2.3 Análisis estadístico .....	40
3. CULTIVOS CELULARES.....	41
3.1 Líneas celulares y mantenimiento.....	41
3.2 Cultivo en 3D .....	41
3.3 Determinación del IC <sub>50</sub> y ensayos de proliferación celular.....	43
3.3.1 Formación de colonias .....	44
3.4 Estudios de viabilidad celular en 3D y determinación del IC <sub>50</sub> .....	44
3.4.1 Estudios de post esferas.....	44
3.5 Estudios de ciclo celular .....	45
3.6 Estudios de migración e invasión .....	45
3.6.1 Migración e invasión en 2D.....	45
3.6.2 Migración e invasión en 3D.....	46
3.7 Estudios de proteína .....	46
3.7.1 Extracción y cuantificación de proteínas.....	46
3.7.2 Western Blot. ....	46
3.8 Estudios de ARN .....	47
3.8.1 Extracción del ARN .....	47
3.8.2 Síntesis del ADNc y análisis de la expresión génica.....	48
4. INMUNOHISTOQUÍMICA. ....	48
4.1 Construcción de matrices tisulares (TMAs).....	48
4.2 Inclusión de células en bloques de parafina .....	48
4.3 IHQ en líneas celulares y tejidos parafinados .....	49
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LAS PACIENTES.....	52
2. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES CLÍNICAS .....	53
3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE VARIABLES GÉNICAS.....	53
4. GENERACIÓN DE MODELOS DE SUPERVIVENCIA .....	54
4.1 Validación <i>in silico</i> de los perfiles de supervivencia.....	56
5. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL DE UN PANEL DE LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA DE OVARIO .....	57

5.1 Descripción de las líneas celulares. Cultivo en 2D. ....	57
5.1.1 Formación de colonias .....	60
5.2 Formación de esferas. Cultivo en 3D. ....	61
5.3 Respuesta a CDDP .....	63
5.3.1 Cálculo del IC <sub>50</sub> .....	63
5.3.2 Efecto del CDDP sobre la formación de colonias .....	65
5.3.3 Efecto del CDDP sobre el ciclo celular.....	66
5.4 Invasión y Migración. ....	67
5.4.1 Invasión y Migración en 2D .....	67
5.4.2 Invasión y Migración en 3D .....	67
6. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE MARCADORES DE TEM .....	69
6.1 IHQ en tejido tumoral .....	69
6.2 IHQ en líneas celulares. ....	72
7. SLC39A6.....	75
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	77
1. GENERACIÓN DE MODELOS DE SUPERVIVENCIA .....	78
1.1 Aspectos metodológicos y análisis estadístico.....	78
1.3 Descripción de la muestra de estudio .....	80
1.4 Variables analizadas .....	81
1.4.1 Variables clínicas .....	81
1.4.2 Variables génicas .....	82
1.5 Perfiles de supervivencia.....	83
1.5.1 Genes comunes a ambos perfiles.....	85
1.6 Estudio inmunohistoquímico en tejido tumoral .....	87
1.7 Otros estudios de perfiles y TEM .....	89
2. CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE UN PANEL DE LÍNEAS CELULARES DE CO .....	91
2.1 Cultivo en 3D .....	91
2.2 Respuesta a CDDP .....	93
2.3 Estudio inmunohistoquímico de marcadores de TEM .....	94
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	96
<b>VII. ANEXO</b> .....	98
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	109
<b>IX. RESUMEN</b> .....	132
<b>X. SUMMARY</b> .....	134

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Datos de incidencia y mortalidad para el cáncer de ovario en el mundo en el año 2012.....	2
<b>Figura 2.</b> Tinciones con hematoxilina y eosina sobre cortes de los distintos subtipos histológicos de CO .....	7
<b>Figura 3.</b> Esquema del proceso de TEM.....	16
<b>Figura 4.</b> Esquema de las principales vías de señalización implicadas en el proceso de TEM....	23
<b>Figura 5.</b> Imágenes de inmunohistoquímica (IHQ) con el marcador de proliferación celular ki-67 realizadas sobre esferas cultivadas durante 4 y 7 días. ....	28
<b>Figura 6.</b> Esquema de una MW96 para los experimentos de determinación del IC <sub>50</sub> y proliferación celular .....	43
<b>Figura 7.</b> Curvas KM de SLP y SG según la cirugía óptima.....	53
<b>Figura 8.</b> A. Curvas ROC y KM de predicción para los modelos de SLP y SG .....	56
<b>Figura 9.</b> Curvas KM de la validación <i>in silico</i> de los modelos del gen SLC39A6.....	57
<b>Figura 10.</b> Fotografías de las distintas líneas celulares de CO utilizadas en el estudio .....	59
<b>Figura 11.</b> Características de crecimiento de las líneas celulares de CO .....	60
<b>Figura 12.</b> Colonias individuales de cada una de las líneas celulares .....	61
<b>Figura 13.</b> Líneas celulares cultivadas en 3D durante 4 días.....	62
<b>Figura 14.</b> Viabilidad de esferas de la línea PEO23 tratadas con concentraciones decrecientes de CDDP.....	64
<b>Figura 15.</b> Efecto del CDDP sobre la formación de colonias en las líneas PEA1 y PEA2 .....	65
<b>Figura 16.</b> Efecto del tratamiento con CDDP sobre el ciclo celular .....	66
<b>Figura 17.</b> Migración celular de las líneas de CO a las 22 horas usando el sistema de FluoroBlok™ .....	68
<b>Figura 18.</b> Migración e invasión en 3D sobre Matrigel de las líneas SKOV3 y 59M.....	68
<b>Figura 19.</b> Curvas KM de supervivencia para proteínas analizadas mediante IHQ.....	71
<b>Figura 20.</b> Patrones de expresión proteica de 5 de los genes comunes en los perfiles de supervivencia y Snail en cáncer de ovario .....	72
<b>Figura 21.</b> IHQ con ECAD en las líneas celulares cultivadas en 3D.....	74
<b>Figura 22.</b> Análisis de expresión proteica de SLC39A6 en <i>pellet</i> y esferas .....	76

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Estadificación FIGO 2014 del cáncer de ovario, cáncer de trompas de Falopio y cáncer peritoneal .....	9
<b>Tabla 2.</b> Principales ventajas e inconvenientes del cultivo <i>in vitro</i> .....	26
<b>Tabla 3.</b> Genes relacionados con la TEM y genes control analizados en el estudio de expresión.....	38
<b>Tabla 4.</b> Líneas de CO utilizadas.....	42
<b>Tabla 5.</b> Anticuerpos utilizados en <i>Western Blot</i> .....	47
<b>Tabla 6.</b> Anticuerpos utilizados en la IHQ y localización en tejido tumoral y líneas celulares ...	50
<b>Tabla 7.</b> Variables clínico-patológicas analizadas. ....	52
<b>Tabla 8.</b> Análisis univariante para SLP y SG con respecto a las variables clínicas.....	53
<b>Tabla 9.</b> Modelos combinados de supervivencia (SLP y SG) .....	55
<b>Tabla 10.</b> Valores R de las curvas ROC a distintos tiempos y p-valor asociado para los modelos de supervivencia. ....	55
<b>Tabla 11.</b> Principales características de las líneas celulares. ....	58
<b>Tabla 12.</b> Características de las líneas celulares tras el tratamiento con CDDP. ....	65
<b>Tabla 13.</b> Frecuencias de las proteínas obtenidas en la IHQ sobre tejido tumoral con los genes implicados en los perfiles de supervivencia.....	69
<b>Tabla 14.</b> Frecuencias de las proteínas obtenidas en la IHQ sobre tejido tumoral con los principales marcadores de TEM.....	70
<b>Tabla 15.</b> Valoración de los principales marcadores de TEM en las líneas celulares de CO.....	73
<b>Tabla 16.</b> Valoración IHC en las líneas celulares de CO de los 5 genes comunes a los perfiles de supervivencia .....	75

## Glosario de Siglas, Acrónimos y Abreviaturas utilizadas

**$\alpha$ -SMA:** alfa actina 2 (*Alpha Smooth Muscle Actin*)  
**2D:** dos dimensiones  
**3D:** tres dimensiones  
**5-FU:** 5-fluorouracilo  
**ADN:** ácido desoxirribonucleico  
**ADNc:** ADN complementario  
**ARID1A:** *AT-Rich Interaction Domain 1A*  
**ARN:** Ácido Ribonucleico  
**ARNm:** ARN mensajero  
**BCAT:**  $\beta$ -catenina  
**bHLH:** factores de conformación básica hélice-lazo-hélice (*basic Hélix-Loop-Helix*)  
**BRCA:** *Breast Cancer*  
**BRAF:** proto-oncogén B-Raf serina/treonina kinasa  
**C-Kit:** proto-oncogén KIT receptor tirosina kinasa  
**CA125:** Antígeno Cancerígeno 125  
**CAFs:** fibroblastos asociados al cáncer (*Cancer Associated Fibroblasts*)  
**CaIAM:** Calceína AM  
**CCC:** Carcinoma de Células Claras  
**CDDP:** cisplatino  
**CDK12:** kinasa dependiente de ciclina 12 (*Cyclin-Dependent Kinase 12*)  
**CDX2:** *Caudal Type Homeobox 2*  
**CECC:** Carcinoma Escamoso de Cabeza y Cuello  
**CO:** Carcinoma de Ovario  
**CSC:** células madre del cáncer (*Cancer Stem Cells*)  
**CTBP:** *C-Terminal Binding Protein*  
**CTNNB1:** gen de la  $\beta$ -catenina  
**DLP:** Doxorubicina Liposomal Pegilada  
**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*  
**EC:** carcinoma endometriode (*Endometrioid Carcinoma*)  
**ECACC:** colección europea de cultivos celulares (*European Collection of Cell Culture*)  
**ECAD:** cadherina E  
**EGF:** factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*)  
**EGFR:** receptor factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*)  
**ER:** Enfermedad Residual  
**FBS:** suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)  
**FDR:** *False Discovery Rate*  
**FIGO:** Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia  
**FGF:** factor de crecimiento fibroblástico (*Fibroblast Growth Factor*)  
**FN:** fibronectina  
**FOXC2:** *Forkhead Box C2*  
**FOXM1:** *Forkhead Box M1*  
**FSP1:** proteína específica de fibroblastos-1 (*Fibroblast-Specific Protein 1*)  
**GIST:** tumor del estroma gastrointestinal (*Gastrointestinal Stromal Tumor*)

**GSK3-β:** Glucógeno Sintasa Kinasa 3-β

**GST:** Gen/genes Supresores de Tumores

**HER2:** *Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2*

**HGF:** factor de crecimiento de hepatocitos (*Hepatocyte Growth Factor*)

**HGEC:** Carcinoma endometrioide de alto grado (*High Grade Endometrioid Carcinoma*)

**HGSOC:** carcinoma seroso de alto grado (*High Grade Serous Ovarian Carcinoma*)

**HIF-1α:** factor inducible por hipoxia 1-alfa (*Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha*)

**HIF-2α:** factor inducible por hipoxia 2-alfa (*Hypoxia-Inducible Factor 2-Alpha*)

**HK:** genes de control endógeno (*Housekeeping genes*)

**HNF1-β:** HNF1 Homeobox B

**HNPPC:** cáncer colorrectal hereditario no polipósico (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*)

**HR:** *Hazard Ratio*

**I.C.:** Intervalo de Confianza

**ID:** inhibidores de unión a ADN (*Inhibitor of DNA binding*)

**IOSE:** células inmortalizadas de epitelio ovárico (*Immortalized Ovarian Surface Epithelium*)

**IHQ:** inmunohistoquímica

**ILP:** intervalo libre de platino

**IP:** yoduro de propidio

**iPARP:** inhibidores de PARP

**KRAS:** *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*

**Lasso:** *Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*

**LEF:** *Lymphoid Enhancer Factor*

**LGSOC:** carcinoma seroso de bajo grado (*Low Grade Serous Ovarian Carcinoma*)

**LOX:** Lisil Oxidasa

**MAPK:** proteínas quinasas activadas por mitógeno (*Mitogen-Activated Protein Kinases*)

**MC:** carcinoma mucinoso (*Mucinous Carcinoma*)

**MEC:** Matriz Extracelular

**MLH1:** *MutL Homolog 1*

**miARN:** micro ARN

**MMPs:** metaloproteasas de matriz (*Matrix Metalloproteinases*)

**MSH2:** *MutS Homolog 2*

**MSH6:** *MutS Homolog 6*

**MUC1:** antígeno epitelial de membrana (*Mucin 1*)

**NCAD:** cadherina N

**NF1:** *Neurofibromin 1*

**OR:** *Odds Ratio*

**P16:** inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas 2A (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*)

**PARP:** polimerasa poli-ADP ribosa (*Poly ADP-Ribose Polymerase*)

**PBS:** tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)

**PCAD:** cadherina P

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

**PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factor*)

**PDX:** xenoinjertos derivados de paciente (*Patient Derived Xenograft*)

**PI3K:** fosfoinositol-3 kinasa

**PKGB:** placoglobina

**PMS2:** *PMS1 Homolog 2*

**PTEN:** *Phosphatase And Tensin Homolog*

**R0:** resección completa

**RB1:** Retinoblastoma 1

**ROC:** *Receiver Operating Curves*

**RPMI:** *Roswell Park Memorial Institute medium*

**RT-qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa (*Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

**SDF1:** factor derivado del estroma 1 (*Stromal Derived Factor 1*)

**SG:** Supervivencia Global

**SLC39A6:** *Solute Carrier Family 39 Member 6*

**SLP:** Supervivencia Libre de Progresión

**SNAI1:** *Snail Family Zinc Finger 1*. Codifica para Snail

**SNAI2:** *Snail Family Zinc Finger 2*. Codifica para Slug

**SNAI3:** *Snail Family Zinc Finger 3*. Codifica para SNAI3

**SRB:** sulforrodamina B

**STIC:** carcinoma seroso intraepitelial de las trompas (*Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma*)

**TCF:** factor de células T (*T-Cell Factor*)

**TCGA:** Atlas del Genoma del Cáncer (*The Cancer Genome Atlas*)

**TEM:** Transición Epitelio-Mesénquima

**TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento transformante beta (*Transforming Growth Factor Beta*)

**TLDA:** tarjetas microfluidicas de baja densidad (*Taqman Low Density Array*)

**TMA:** matriz tisular (*Tissue Microarray*)

**TME:** Transición Mesénquima-Epitelio

**TP53:** proteína tumoral P53 (*Tumor Protein P53*)

**TTBS:** tampón tris salino con Tween 20 (*Tween 20-Tris Buffered Saline*)

**ULA:** placas de cultivo de baja adherencia (*Ultra Low Attachment*)

**VEGF:** factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

**VIM:** vimentina

**WB:** *Western Blot*

**WT1:** *Wilms Tumor 1*

**ZEB:** *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox*

## **RESUMEN.**

El cáncer de ovario se asocia a una elevada mortalidad, principalmente debido a que se diagnostica en fases avanzadas de la enfermedad, y a que, pese a tener una elevada tasa de respuesta al tratamiento inicial, en una mayoría de los casos, se acabará produciendo una recidiva.

El proceso de la transición epitelio mesénquima (TEM) hace referencia a un proceso altamente regulado que implica un cambio fenotípico por el cual las células pasan de tener características epiteliales a mesenquimales, afectando a su crecimiento, migración e invasión, y se relaciona con la agresividad tumoral y el desarrollo de metástasis.

El estudio molecular de genes relacionados con la TEM en una cohorte de 84 pacientes con carcinoma de ovario avanzado, mediante RT-qPCR en tarjetas microfluídicas, ha identificado dos perfiles de expresión génica, uno para supervivencia libre de progresión (SLP), compuesto de 10 genes, y otro para supervivencia global (SG), compuesto por 6 genes. Los estudios de expresión proteica en estos tumores sugieren que HIF-2 $\alpha$ , Snail y SPARC pueden representar biomarcadores con significado pronóstico en el carcinoma de ovario.

Por otro lado, los modelos *in vitro* para el estudio de la biología molecular del cáncer han evolucionado en las últimas décadas, permitiendo solventar algunos de sus inconvenientes, como es la carencia de arquitectura tisular, con la utilización de modelos tridimensionales (3D). En este trabajo se han establecido estos modelos a partir de un panel de 16 líneas celulares de cáncer de ovario, y se han caracterizado exhaustivamente en cuanto a sus propiedades basales y a la expresión de marcadores de TEM. Estos ensayos *in vitro* han confirmado la heterogeneidad de estas líneas celulares poniendo de manifiesto, por un lado, la necesidad de seleccionar minuciosamente los modelos preclínicos en base a los objetivos de cada estudio y por otro, que, dada la peculiar vía de diseminación en estos tumores, los modelos 3D representan un buen sistema alternativo para su estudio, sobre todo en cuanto al comportamiento farmacológico. Nuestros resultados *in vitro* indican que *SLC39A6* podría estar relacionado con fenómenos de resistencia a platino y recaída.

En todo caso, estos resultados deben ser interpretados con cautela y serán necesarios estudios prospectivos de validación en series independientes, así como estudios funcionales *in vitro* para confirmar su valor pronóstico.



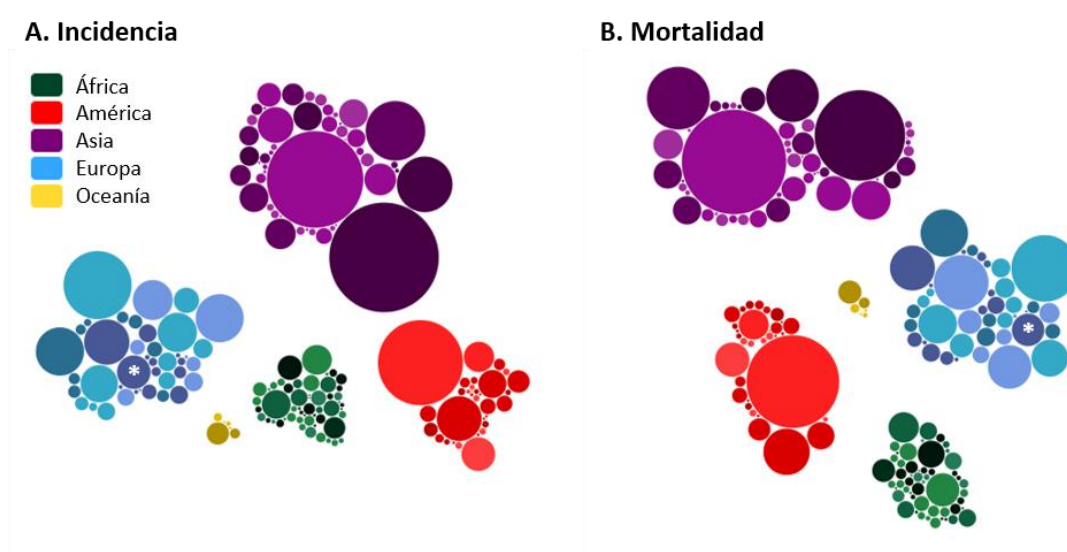
## I. INTRODUCCIÓN

## 1. CÁNCER DE OVARIO.

### 1.1 Epidemiología.

El cáncer de ovario es el quinto tumor más frecuente en mujeres en España después del cáncer de mama, colon, cérvix y pulmón, y representa la sexta causa de muerte por cáncer. Se estima que en nuestro país se diagnosticaron 3.395 mujeres de cáncer de ovario en 2015, y 1.981 (58,4%) murieron a causa de esta enfermedad. La incidencia del cáncer de ovario es de 7,7 por 100.000 mujeres y año, con una prevalencia a los 5 años de 79,25 por 100.000 mujeres (1, 2).

La mayoría de los carcinomas de ovario se diagnostican en mujeres postmenopáusicas, con una mediana de edad de 60 años y más de la mitad de las enfermas fallecen a consecuencia de la enfermedad. Esto es debido, principalmente, a que no existen síntomas específicos en los estadios iniciales, y a la ausencia de técnicas de detección precoz validadas, lo que ocasiona que el diagnóstico se realice en fases tardías de la enfermedad en un 75% de los casos (3, 4).



**Figura 1.** Datos de incidencia y mortalidad para el cáncer de ovario en el mundo en el año 2012. Cada círculo representa un país, y el tamaño es indicativo del número de casos. \* representa a España.

Fuente: Globocan 2012 (2).

### 1.2 Factores de riesgo.

Se estima que un 10-15% de los cánceres de ovario son consecuencia de un síndrome hereditario. El síndrome que con más frecuencia ocasiona este tumores el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario que se asocia a mutaciones en los genes *BRCA1* o *BRCA2*, implicados en reparación por recombinación homóloga del ácido desoxirribonucleico (ADN)

(4). El segundo síndrome es el de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPPC; *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*). En este caso, las pacientes presentan mutaciones en los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*, que participan en la vía de reparación del ADN para errores en el apareamiento de bases (5, 6).

En los casos de cáncer de ovario esporádico los principales factores de riesgo clásicos incluyen la edad, la obesidad, el síndrome de ovario poliquístico, la nuliparidad, la menarquia precoz, la menopausia tardía, la terapia hormonal sustitutiva y la endometriosis (3, 7). Sin embargo, el uso de anticonceptivos orales, el embarazo, la lactancia y la ligadura de trompas están asociados con una disminución del riesgo de padecer cáncer de ovario (8-10).

### 1.3 Etiopatogenia.

El origen del carcinoma de ovario (CO) es un tema muy controvertido, y existe bastante debate sobre cuáles son sus células precursoras. Uno de los mayores problemas a la hora de identificar el origen de esta patología es que no se trata de una única enfermedad, sino de un grupo heterogéneo de tumores, con distinto origen, distintas características clinicopatológicas y distintos comportamientos clínicos, que comparten la misma localización anatómica (11, 12). La carcinogénesis ovárica podría estar asociada al proceso de la ovulación y producción de hormonas (13) y, tradicionalmente, se ha considerado que el CO surgía tras la malignización del epitelio celómico que recubre la superficie del ovario o por la formación de quistes de inclusión corticales (14). Más recientemente se ha sugerido que el origen del carcinoma seroso de alto grado (HGSOC; *High Grade Serous Ovarian Carcinoma*), el histotipo más frecuente de CO, podría estar en las fimbrias de las trompas de Falopio, la parte distal de las mismas, que está en contacto directo con la superficie del ovario (15-17).

Hay múltiples estudios de expresión génica que han demostrado que los perfiles de expresión de los HGSOC son más parecidos a los del epitelio de las trompas de Falopio que a los del epitelio ovárico (18) y, además, las mutaciones en el gen *TP53* presentes en el carcinoma seroso intraepitelial de las trompas (STIC; *Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma*) son idénticas a las mutaciones encontradas en el CO, lo que sugiere una relación clonal entre ambas patologías (19). En este sentido, parece que las células de los STIC tienen los telómeros más cortos que las células del CO y, por tanto, el STIC sería anterior al CO en la evolución clonal propuesta (20).

El resto de tipos histológicos de CO parecen tener distintos orígenes. Así, el carcinoma seroso de bajo grado (LGSOC; *Low Grade Serous Ovarian Carcinoma*) se desarrollaría por evolución a partir de tumores de bajo potencial de malignidad, mientras que la endometriosis

se ha sugerido como lesión precursora del carcinoma endometrioide (EC; *Endometrioid Carcinoma*) y el carcinoma de células claras (CCC) (21).

#### 1.4 Clasificación del cáncer de ovario.

El carcinoma de ovario incluye a un grupo de neoplasias heterogéneas que se clasifican, atendiendo a su histología, en: seroso de alto grado, seroso de bajo grado, mucinoso, endometrioide y de células claras. Sin embargo, ninguno de estos tipos celulares se encuentra en el ovario normal, y su desarrollo ha sido atribuido durante mucho tiempo a una neometaplasia mülleriana del epitelio ovárico (mesotelio) (22).

De acuerdo a un modelo dual de carcinogénesis ovárica propuesto por Shih y Kurman, el carcinoma de ovario puede dividirse en dos categorías dependiendo de la vía implicada en el desarrollo el tumor (23).

- Tipo I: carcinomas que evolucionan a partir de tumores con bajo potencial de malignidad. Esta categoría incluye los LGSOC, carcinomas mucinosos (MC; *Mucinous Carcinoma*), EC y CCC.
- Tipo II: carcinomas que aparecen *de novo*, en estadio avanzado en el 75% de los casos y cuyo origen suele estar en las trompas de Falopio. Incluye los HGSOC, carcinosarcomas y carcinomas indiferenciados.

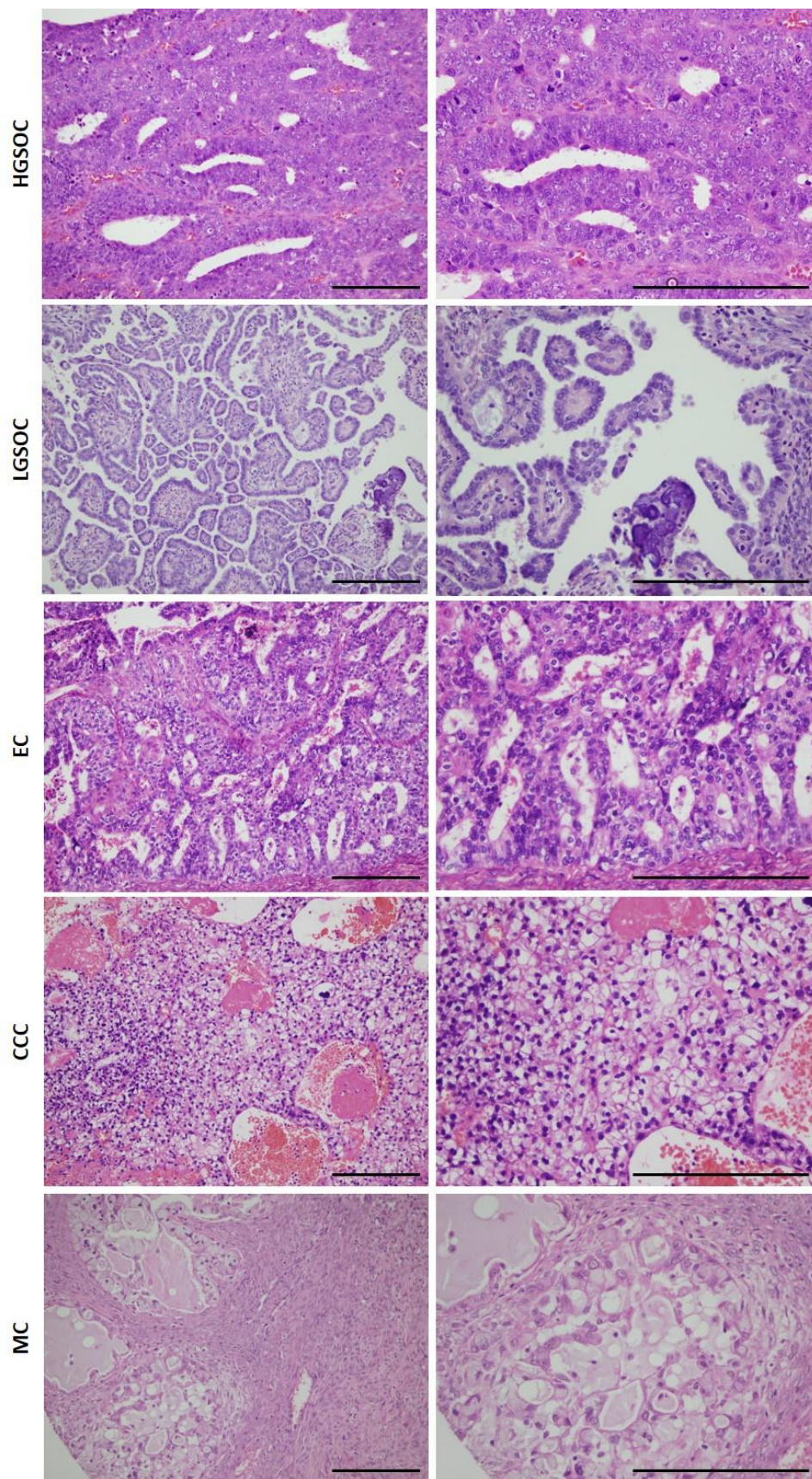
Estos tumores difieren también en la epidemiología, factores de riesgo genéticos, lesiones precursoras, patrones de dispersión, respuesta a quimioterapia y supervivencia (24). Recientemente se han identificado también distintos subtipos moleculares de CO, que se comentarán en un apartado posterior.

- Carcinoma seroso de alto grado (HGSOC): es el subtipo histológico más frecuente. Representa aproximadamente el 70% de todos los CO y la mayoría de las pacientes (aproximadamente el 80%), debutan con estadio avanzado de la enfermedad. A nivel microscópico, los HGSOC suelen mostrar papilas y un crecimiento sólido o con microquistes. Las células tumorales son de tamaño intermedio, con nucléolos prominentes (Figura 2). Estos tumores muestran una variación en el tamaño nuclear de más de tres veces, una relación núcleo-citoplasma elevada y una gran actividad mitótica. A nivel inmunohistoquímico, la mayoría de los HGSOC expresan P53, WT1 y P16 (22, 24, 25). Estos tumores presentan una alta inestabilidad cromosómica y las alteraciones moleculares más frecuentes se dan en el gen *TP53* (mutación o delección) y también en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, tanto a nivel germinal como somático (26, 27).

- Carcinoma seroso de bajo grado (LGSOC): son tumores infrecuentes y representan menos del 5% de todos los CO (28). Normalmente presentan un margen de crecimiento expansivo, y en la mayoría de los casos, provienen de tumores serosos de bajo potencial de malignidad (tumores serosos proliferativos atípicos o tumores serosos *borderline*). Microscópicamente los LGSOC muestran pequeñas papilas de células tumorales con núcleos uniformes y cantidades variables de estroma hialinizado que en muchas ocasiones contiene cuerpos de psammoma. La uniformidad de los núcleos es el principal criterio de distinción con los HGSOC, con una variabilidad inferior a tres veces (Figura 2) (29). Otro aspecto diferencial es que los LGSOC no muestran inestabilidad cromosómica. Las mutaciones características de estos tumores se dan en los genes *BRAF* y *KRAS*, con unas frecuencias de 38% y 19% respectivamente (30). Las mutaciones en *BRAF* están asociadas con un mejor pronóstico (31).
- Carcinoma endometriode (EC): los tumores endometrioides del ovario son muy parecidos a los encontrados en el útero. Suponen el 10% de todos los CO y ocurren de manera más frecuente en mujeres peri- o post menopáusicas. Hasta el 42% de los casos están relacionados con procesos previos de endometriosis, y el 15%-20% de los casos se asocian con carcinoma del endometrio (32, 33). Al microscopio presentan glándulas tubulares recubiertas de un epitelio estratificado no mucinoso, y pueden aparecer patrones cribiformes o villoglandulares (Figura 2). En más del 50% de los casos presentan una diferenciación escamosa y también pueden aparecer células claras (34, 35). Sin embargo, los EC de alto grado (HGEC; *High Grade Endometrioid Carcinoma*) son prácticamente indistinguibles de los HGSOC y presentan un perfil de expresión génica similar, lo que sugiere que el HGEC no es un tumor diferente (36) y actualmente se tiende a considerar que la mayoría los carcinomas de ovario de alto grado con morfología endometriode forman parte del espectro morfológico del HGSOC, al igual que ocurre con los denominados carcinomas transicionales. Así, recientemente, se ha descrito una variante de HGSOC denominada SET (sólida, pseudoendometriode, transicional) con características inmunofenotípicas superponibles a las encontradas en los HGSOC convencionales. Los EC son inmunorreactivos para vimentina (VIM), citoqueratina 7 (97%), antígeno epitelial de membrana (MUC1) y receptores de estrógeno y progesterona, y son negativos para WT1 (24). Las mutaciones en los genes *CTNNB1* y en *PTEN* son las más frecuentes en el EC, representando el 38%-50% y 20% de las mutaciones respectivamente (37, 38). Se han descrito también mutaciones en *ARID1A* en EC y CCC, así como en endometriosis adyacentes (39). Los EC son los que aparecen con mayor frecuencia en pacientes con

- síndrome de Lynch, en los que se observa inestabilidad de microsatélites y mutaciones en el gen *MLH1* (40, 41).
- Carcinoma de células claras: los CCC representan aproximadamente el 10% de los CO, y al igual que el EC, se asocia con la endometriosis (42). El diagnóstico de estos tumores puede resultar complejo ya que la presencia de células claras no es suficiente; se pueden encontrar células con citoplasma claro también en HGSOC y en EC (43, 44). Las características microscópicas del CCC incluyen múltiples papilas complejas, denso material hialino de membrana basal expandiendo el núcleo de las papilas, y la presencia de cuerpos hialinos presentes en el 25% de los casos (Figura 2) (24). A nivel inmunohistoquímico, más del 90% de los CCC son positivos para HNF1- $\beta$ , y negativos para WT1 y receptores de estrógenos en más del 95% de los casos (45). En cuanto a las alteraciones genéticas, casi la mitad de los CCC (46%-57%) presentan mutaciones inactivadoras en el gen *ARID1A* (39).
  - Carcinoma mucinoso: únicamente el 3%-4% de los CO son de tipo mucinoso (22). El origen de los MC es desconocido y la mayoría de ellos muestran una diferenciación gastrointestinal. Los MC primarios suelen ser de gran tamaño (más de 13 cm), unilaterales y confinados al ovario sin implicación de la superficie epitelial, mientras que las metástasis son de menor tamaño y de afectación bilateral (24). A nivel histopatológico los MC son tumores heterogéneos, y en una misma neoplasia pueden coexistir patrones de tumores benignos, de bajo potencial de malignidad, de carcinomas intraepiteliales y de cánceres invasivos. Por tanto, en este tipo de tumores es muy importante que la muestra para el examen histopatológico sea representativa del tumor. Los MC están compuestos de papilas y áreas sólidas y sus células se caracterizan por presentar citoplasmas con grandes cantidades de mucina y grandes áreas de necrosis y hemorragia (Figura 2) (46). Los MC expresan genes de diferenciación intestinal como *CDX2* y *KRAS*. Las mutaciones en *KRAS* son frecuentes, aparecen en el 65% de los casos, y tienen lugar en etapas tempranas de la tumorigénesis (47, 48). Además, el gen *HER2* está amplificado en el 15%-20% de estos tumores (49).





**Figura 2.** Tinciones con hematoxilina y eosina sobre cortes de los distintos subtipos histológicos de CO. Panel izquierdo, imágenes tomadas a 20X (escala 200 µm). Panel derecho, imágenes tomadas a 40X (escala 100 µm).

### 1.5 Estadificación del cáncer de ovario.

El cáncer de ovario se clasifica en cuatro estadios según la extensión de la enfermedad. En la mayoría de los casos, la estadificación se realiza tras el estudio anatomopatológico del tumor extirpado en la cirugía, siguiendo los criterios de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) (Tabla 1) (50). El cáncer peritoneal primario y el cáncer de trompa de Falopio son patologías raras, pero tienen muchas similitudes biológicas con el cáncer de ovario. Por tanto, a nivel clínico, estas tres patologías se manejan de forma similar (51).

### 1.6 Historia natural y diagnóstico del cáncer de ovario.

En el cáncer de ovario no existen barreras anatómicas para evitar la dispersión de las metástasis por la cavidad peritoneal, y el tumor se disemina fundamentalmente por extensión directa (siembra peritoneal) a las estructuras pélvicas adyacentes. En esta situación, las células neoplásicas se desprenden del tumor primario y se implantan en el peritoneo, el epiplón y las superficies serosas viscerales. La circulación del líquido peritoneal facilita la dispersión de los implantes tumorales por la cavidad abdominal y éstos obstruyen los vasos linfáticos, impiden la reabsorción de líquido peritoneal y favorecen su acumulación en la cavidad abdominal, generando la formación de ascitis (52). Adicionalmente, la diseminación se puede dar por vía linfática, con una vía principal de drenaje a los ganglios retroperitoneales y pélvicos. En casos de enfermedades muy avanzadas, la diseminación por vía hematógena puede producir metástasis hepáticas, pulmonares, óseas y cerebrales (53-56).

Habitualmente, las etapas iniciales del cáncer de ovario suelen cursar sin síntomas, o con síntomas muy leves que pasan desapercibidos y pueden confundirse con otras patologías (4, 57). El 70% de las pacientes se diagnostican en fases avanzadas, habitualmente tras una diseminación peritoneal, siendo en estos casos muy frecuente la existencia de ascitis o derrame pleural (51).

Ante la sospecha de cáncer de ovario, la primera prueba diagnóstica es una ecografía transvaginal, y el diagnóstico histológico definitivo se obtiene tras la extirpación quirúrgica de la lesión (4, 58). Antes de la cirugía también es frecuente la realización de un escáner de la zona abdominal y una radiografía o tomografía computerizada (TC) de tórax para evaluar la presencia de enfermedad extrapélvica, así como la cuantificación del marcador tumoral CA125 en sangre.



**Tabla 1.** Estadificación FIGO 2014 del cáncer de ovario, cáncer de trompas de Falopio y cáncer peritoneal.

<b>Estadio I.</b> Limitado a los ovarios o las trompas de Falopio.	
IA	Tumor limitado a un ovario (cápsula intacta) o trompa de Falopio. Ausencia de tumor en la superficie ovárica o en la de las trompas de Falopio. Ausencia de células malignas en la ascitis o en los lavados peritoneales.
IB	Tumor limitado a ambos ovarios (cápsulas intactas) o a ambas trompas de Falopio. Ausencia de tumor en las superficies ováricas o tubáricas. Ausencia de células malignas en la ascitis o en los lavados peritoneales.
IC	Tumor limitado a uno o ambos ovarios o trompas de Falopio con cualquiera de las siguientes lesiones: IC1 – Rotura operatoria. IC2 – Cápsula rota preoperatoria o tumor en superficie ovárica o tubárica. IC3 – Presencia de células malignas en la ascitis o en los lavados peritoneales.
<b>Estadio II.</b> El tumor se encuentra en uno o ambos ovarios o trompas de Falopio con extensión pélvica (por debajo del promontorio), o cáncer peritoneal primario.	
IIA	Extensión y/o implantes en el útero y/o trompas de Falopio y/u ovarios.
IIB	Extensión a otros tejidos pélvicos intraperitoneales.
<b>Estadio III.</b> El tumor afecta a uno o ambos ovarios o trompas de Falopio, o bien se trata de cáncer peritoneal primario con diseminación peritoneal extrapélvica, y/o metástasis ganglionares retroperitoneales confirmadas citológica o histológicamente.	
IIIA	Metástasis microscópica peritoneal fuera de la pelvis (por encima del promontorio), no tumor macroscópico, con o sin metástasis a los ganglios linfáticos retroperitoneales. IIIA1 – Exclusivamente metástasis a ganglios linfáticos retroperitoneales (pélvicos y/o paraaórticos) confirmadas citológica o histológicamente. IIIA1 (i) Metástasis de hasta 10 mm de diámetro mayor. IIIA1 (ii) Metástasis de más de 10 mm de diámetro mayor. IIIA2 – Metástasis extrapélvicas microscópicas con o sin afectación de ganglios linfáticos retroperitoneales.
IIIB	Metástasis macroscópica peritoneal fuera de la pelvis de un tamaño menor o igual a 2 cm con o sin metástasis a los ganglios linfáticos retroperitoneales.
IIIC	Metástasis macroscópica peritoneal fuera de la pelvis de un tamaño mayor a 2 cm con o sin metástasis a los ganglios linfáticos retroperitoneales. La extensión a la cápsula hepática y esplénica se clasifica como estadio IIIC.
<b>Estadio IV.</b> El tumor afecta a uno o ambos ovarios con metástasis a distancia (excluidas las metástasis peritoneales).	
IVA	Derrame pleural con citología positiva para células malignas.
IVB	Metástasis parenquimatosas y metástasis a órganos extra-abdominales, incluidos los ganglios linfáticos inguinales y los localizados fuera de la cavidad abdominal. Metástasis en el parénquima hepático es igual a estadio IVB.

## 1.7 Tratamiento del cáncer de ovario.

### 1.7.1 Primera línea de tratamiento.

Si tras la realización de las pruebas comentadas en el apartado previo se sospecha de la presencia de un cáncer de ovario, normalmente se realiza una laparotomía para la confirmación histológica, y proceder a la extirpación del tumor y a la estadificación quirúrgica.

En el cáncer de ovario avanzado (estadios III y IV), el resultado de la cirugía se clasifica atendiendo a la cantidad de tumor residual. La citorreducción completa del tumor, también denominada R0, se obtiene cuando no quedan restos macroscópicos del tumor. Hace años se utilizaba el concepto de citorreducción óptima en aquellos casos en los que la resección era completa o quedaba tumor residual menor de 1 cm. Desde el consenso internacional del GCIG (*Gynecologic Cancer Inter Group*) de 2010 se reserva el término de citorreducción óptima a la ausencia de enfermedad residual (ER), es decir, un sinónimo de citorreducción completa. Aun así, en caso de tumor residual, en la actualidad es importante que el cirujano siga indicando si es menor o mayor de 1 cm, ya que este aspecto influye en el pronóstico y en las opciones terapéuticas (59).

Las pacientes de bajo riesgo (estadio I) no presentan beneficios a nivel de supervivencia global (SG) con la administración de tratamiento quimioterápico, con lo cual no está indicado (60, 61). El resto de las pacientes, en las que el riesgo de recaída aumenta, deben recibir quimioterapia. Existen opciones de tratamiento que contemplan la quimioterapia neoadyuvante e intraperitoneal (62), pero el tratamiento inicial estándar suele ser una combinación de sales de platino y taxano, normalmente carboplatino y paclitaxel, que se administra por vía intravenosa en 6 ciclos cada 21 días tras la cirugía citorréductora (63). Otras opciones, que consideran la adición de fármacos dirigidos, se describen más adelante.

### 1.7.2 Tratamiento a la recaída.

Actualmente, la elección de tratamiento para cáncer de ovario recurrente se basa en el intervalo libre de platino (ILP), es decir, el intervalo de tiempo transcurrido desde el último tratamiento con platino y la detección de la recaída.

En pacientes con una recaída con ILP mayor de 6 meses (clásicamente llamada “platino sensible”) inicialmente se debe valorar si es posible una cirugía de rescate, aunque el posible beneficio de esta opción está aún siendo evaluada en ensayos clínicos. Las pacientes con R0 en la cirugía primaria, buen estado general y ausencia de ascitis serían las mejores candidatas a la cirugía de rescate. Respecto al tratamiento sistémico, la recomendación general es reutilizar un esquema con platino. La combinación de carboplatino con otros agentes como paclitaxel

(ensayo ICON4/AGO-OVAR-2.2), gemcitabina o doxorubicina liposomal pegilada (DLP), aumenta la respuesta al tratamiento y la supervivencia libre de progresión (SLP) (64-66). Estas pacientes pueden beneficiarse también de esquemas sin platino, como la combinación DLP-trabectedina que, al aumentar el ILP, podrían volver a sensibilizar a las células al platino para posteriores tratamientos (67, 68).

La resistencia al platino se produce en todas las pacientes con CO recurrente antes o después. La eficacia de los tratamientos en estos casos es muy limitada, siendo las opciones más utilizadas paclitaxel semanal, topotecan, gemcitabina o etopósido (69).

### 1.7.3 Terapias dirigidas.

Actualmente, hay dos grupos de fármacos dirigidos a dianas moleculares que han mostrado eficacia en pacientes de cáncer de ovario: inhibidores de la angiogénesis, un proceso importante en el crecimiento tumoral del cáncer de ovario (70), y los fármacos inhibidores de la polimerasa poli-ADP ribosa (iPARP), activos en pacientes con mutaciones en los genes *BRCA* u otros genes implicados en la reparación del ADN por recombinación homóloga (71).

Los estudios más importantes con fármacos antiangiogénicos se han realizado con el anticuerpo monoclonal bevacizumab, dirigido contra el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y fue la primera terapia dirigida aprobada en cáncer de ovario (69). Hasta la fecha, se han obtenido resultados positivos en distintos ensayos clínicos utilizando bevacizumab en primera línea de tratamiento, en los estudios ICON7 y GOG-0218 (72, 73), y también en segunda línea, tanto en pacientes platino sensibles, en el estudio OCEANS (74), como en pacientes platino resistentes, en el estudio AURELIA (75). En todos estos ensayos se observa un beneficio en la SLP (12), que hace que exista una investigación clínica activa en el campo, con multitud de fármacos dirigidos a la inhibición de la angiogénesis (76-78).

Olaparib es el primer iPARP aprobado en cáncer de ovario, que ha mostrado un incremento en la SLP, como terapia de mantenimiento tras obtener una respuesta a la quimioterapia (combinación con platino) en pacientes con recaídas sensibles a platino y con mutaciones, germinales o somáticas, en los genes *BRCA* (79). Los buenos resultados obtenidos han supuesto el desarrollo de multitud de ensayos (76, 80), y el hecho de haber obtenido también beneficio, aunque menor, en pacientes sin estas mutaciones, sugiere que podrían tener mutaciones en otros genes implicados en la reparación del ADN por recombinación homóloga (81, 82). El trabajo del consorcio del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA; *The Cancer Genome Atlas*) y otros más recientes han descrito que el 50% de todos los HGSOC presentan

alteraciones (mutaciones germinales, somáticas o bien silenciamiento epigenético) en alguno de los genes de reparación por recombinación homóloga (27, 83).

## 1.8 Factores pronósticos y predictivos de respuesta.

Los factores pronósticos y predictivos de respuesta determinan el comportamiento biológico de la enfermedad, y es importante establecer las diferencias entre ellos. Un factor pronóstico debe proporcionar información prospectiva de la evolución del paciente a largo plazo, principalmente la probabilidad de recidiva o la SG. Sin embargo, un factor predictivo de respuesta es capaz de definir el beneficio específico de un tratamiento determinado, evaluando la tasa de respuesta o la SLP (84). Algunos biomarcadores utilizados actualmente en cáncer son los receptores de estrógeno y progesterona y HER2/neu en cáncer de mama, la proteína de fusión BCLR-ABL en leucemia mieloide crónica, mutaciones en *C-Kit* en tumores del estroma gastrointestinal (GIST; *Gastrointestinal Stromal Tumor*) y mutaciones en *EGFR1* en cáncer de pulmón no microcítico (85).

### 1.8.1 Factores clínico-patológicos.

Los factores pronósticos con más peso en el CO son el estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico y la ER tras la cirugía primaria. La ER es, a día de hoy, el factor pronóstico más importante en cáncer de ovario avanzado. Las pacientes con resección completa tienen una media de supervivencia 5 años superior a la de las pacientes con ER (86). La ER, además, tendrá un fuerte impacto en la respuesta al tratamiento quimioterápico. Factores de riesgo adicionales son la edad avanzada, el grado de diferenciación, la presencia ascitis tumoral, y el tipo histológico (21, 87). Respecto a este último, las pacientes con CCC o MC en estadios avanzados de la enfermedad tienen peor pronóstico que el resto de subtipos histológicos debido a que responden peor a los tratamientos quimioterápicos basados en platino (88, 89). Por otro lado, EC es el subtipo con el pronóstico más favorable y se asocia a una mayor supervivencia (22).

El biomarcador más utilizado en la práctica clínica es CA125, una glicoproteína cuya expresión está elevada en el suero del 80% de los pacientes con CO (90). No obstante, CA125 no es un marcador específico de tumor, lo que puede dar lugar a falsos positivos en el diagnóstico de cáncer de ovario (91). Por tanto, CA125 carece de la especificidad y sensibilidad suficientes para actuar como único biomarcador, y debe usarse en combinación con una ecografía transvaginal en el momento del diagnóstico inicial (3). No obstante, la sensibilidad del marcador aumenta en relación con el estadio tumoral y el subtipo histológico (3), y los

niveles postoperatorios de CA125 tienen un gran valor para detectar ER, monitorizar la respuesta al tratamiento y determinar el riesgo de recaída (92).

#### 1.8.2 Factores moleculares.

A pesar de los avances en la detección de nuevos fármacos, los beneficios obtenidos en SG han sido muy discretos. Por tanto, sería importante mejorar las técnicas de detección precoz de la enfermedad, así como la identificación de biomarcadores pronósticos y predictivos de respuesta con el objetivo de poder realizar en el futuro un tratamiento más personalizado, la llamada medicina de precisión. Uno de los principales problemas en el desarrollo de los biomarcadores han sido los criterios de inclusión utilizados en los estudios. Hasta hace relativamente poco tiempo, se agrupaban todos los tumores en un mismo grupo, sin tener en cuenta que son entidades diferentes, y esta situación llevaba a resultados imprecisos. Por este motivo, es muy importante que la evaluación histológica sea realizada por patólogos especialistas en tumores ginecológicos. Por otro lado, las distintas aproximaciones terapéuticas que pueden realizarse en cada centro y los criterios cambiantes en cuanto a la definición de citorreducción óptima pueden ser factores de confusión en el diseño de estudios de búsqueda de biomarcadores en cáncer de ovario (21).

#### Perfiles génicos.

Actualmente, existen firmas de expresión génica comerciales validadas con capacidad pronóstica y/o predictiva de respuesta para algunos tipos de cáncer como, por ejemplo, MammaPrint®, Oncotype DX® y EndoPredict®(93-97). El desarrollo de alguna herramienta similar para cáncer de ovario podría mejorar considerablemente el pronóstico y la calidad de vida de las pacientes, ayudando a elegir la terapia más adecuada para cada una de ellas. En los últimos años, la predicción del pronóstico usando firmas genéticas ha dado lugar a múltiples estudios mediante la utilización de distintas técnicas de alto rendimiento aplicadas a la expresión de ácido ribonucleico (ARN), micro ARN (miARN) o proteínas (84).

En 2008, Tothill y colaboradores publicaron un trabajo en el que analizaron 285 pacientes con CO (en su mayoría HGSO, y 18 serosos de bajo potencial de malignidad), e identificaron seis subtipos moleculares denominados C1-C6. Los subtipos C3 y C6, asociados con un mejor pronóstico, incluían, en su mayoría, tumores de bajo potencial de malignidad y EC en estadios precoces. Estos dos subtipos expresaban bajos niveles de genes relacionados con la proliferación celular y sobreexpresaban genes relacionados con la vía de las MAP kinasas (MAPK), tumores C3, o con la vía de señalización de la  $\beta$ -catenina (BCAT), tumores C6. Los

tumores C1, C2, C4 y C5 comprendían HGSOC y HGEC. Los tumores C1 tenían un perfil de estroma reactivo con altos niveles de desmoplasia y mostraban un peor pronóstico, los tumores C2 y C4 estaban asociados con la activación de la respuesta inmune y los tumores C5 tenían un perfil de expresión mesenquimal (36). Este trabajo fue validado en el año 2013 en una serie independiente de 240 pacientes con CO (98).

Desde el desarrollo de las técnicas de alto rendimiento para el estudio de la expresión génica, han ido apareciendo en la literatura multitud de trabajos sobre perfiles moleculares y su asociación con los subtipos histológicos (99, 100), pronóstico con tratamientos determinados como bevacizumab (101), y, sobre todo, perfiles asociados a la resistencia al tratamiento con platinos (102, 103). Pero sin duda, el trabajo reciente que más datos moleculares ha aportado sobre el CO ha sido el del TCGA.

#### Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA).

Esta herramienta, que ha dado lugar a múltiples publicaciones, recoge la información genética de los distintos tipos de cáncer. En un estudio integrado de la genómica del cáncer de ovario, el proyecto ha analizado la expresión de ARN mensajero (ARNm), la expresión de miARN, la metilación de promotores y el número de copias de ADN de 489 HGSOC, de los cuales 316 fueron también estudiados mediante secuenciación del exoma. En este trabajo se recoge que el 96% de los tumores analizados presentan mutaciones en *TP53*; mutaciones somáticas recurrentes de menor prevalencia en los genes *NF1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *RB1* y *CDK12*; 113 aberraciones en número de copia y metilaciones en el promotor de 168 genes. El análisis identifica también cuatro subtipos a nivel de expresión (inmunorreactivo, diferenciado, proliferativo y mesenquimal), tres subtipos a nivel de miARN, cuatro subtipos de metilación de promotores y un perfil de 193 genes asociado con supervivencia. Apunta también que las pacientes con mutaciones en los genes *BRCA* tienen una mayor supervivencia. Estos trabajos han sido la base para la observación de que el proceso de la recombinación homóloga es defectuoso en aproximadamente la mitad de los tumores analizados y que las vías de *NOTCH* y *FOXM1* están implicadas en la fisiopatología del HGSOC (27). En base a los datos del TCGA se ha identificado también un perfil de 23 genes para identificar pacientes con deficiencias en la vía de reparación del ADN por recombinación homóloga, que está asociado con respuesta a quimioterapia y SLP (104). También se han identificado otros dos perfiles de 100 genes denominados CLOVAR (de subtipo histológico y de supervivencia) que se combinan y predicen respuesta al tratamiento (105), y, recientemente, un perfil de genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima (TEM) que identifica alteraciones moleculares en distintos tipos de cáncer, y posibles dianas terapéuticas (106).

A pesar de los grandes esfuerzos realizados por la comunidad científica, el desarrollo de biomarcadores que sean suficientemente sensibles y específicos no está obteniendo los resultados deseados (107). El estatus de los genes *BRCA* constituye, a día de hoy, el biomarcador más importante identificado en cáncer de ovario (21). Establece diferencias pronósticas y predictivas de respuesta en pacientes tratadas con platino, trabectedina y DLP. Estas pacientes tienen un mejor pronóstico en comparación con las pacientes con cáncer esporádico (108).

## 2. TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA.

### 2.1 Concepto de Transición Epitelio-Mesénquima (TEM).

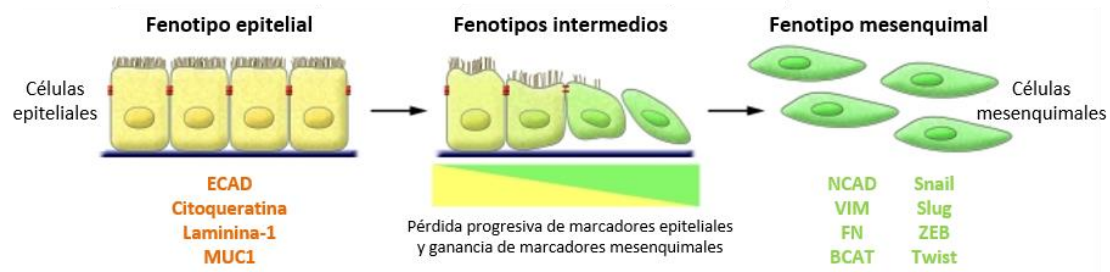
La TEM es un proceso biológico que permite a una célula epitelial llevar a cabo una serie de cambios bioquímicos para adoptar un fenotipo mesenquimal. Este fenotipo confiere a la célula un aumento en sus capacidades migratorias e invasivas, una resistencia a la apoptosis y un incremento en la producción de componentes de matriz extracelular (MEC). El proceso de TEM se da por finalizado cuando se degrada la membrana basal y se forma una célula mesenquimal capaz de migrar del epitelio en el que ha sido originada (109).

Ambos estados, fenotipo epitelial y mesenquimal, son reversibles. La TEM y su proceso opuesto, transición mesénquima-epitelio (TME), fueron descritos por primera vez por Elisabeth Hay en 1968. Usando un modelo de desarrollo embrionario en pollo, propuso que las células epiteliales pueden sufrir grandes cambios fenotípicos que reflejan su “transformación” a células mesenquimales (110). No obstante, al tratarse de una transformación reversible, actualmente se utiliza el término “transición” (111).

Las células epiteliales normalmente exhiben una función específica de tejido mientras que las células mesenquimales tienen una función de soporte (112). El cambio en el fenotipo requiere alteraciones en la morfología, en la arquitectura celular, en la adhesión y en la capacidad migratoria. Las células epiteliales son células adherentes que establecen fuertes contactos con las células adyacentes y un eje de polaridad apicobasal a través de uniones adherentes, desmosomas y uniones estrechas. La capa epitelial mantiene la comunicación a través de las uniones en hendidura y se mantiene separada de tejidos adyacentes por la lámina basal. Las células epiteliales funcionan como barreras y están también implicadas en procesos de absorción (113). Por otro lado, las células mesenquimales o células del estroma, están organizadas de una manera más laxa en una estructura de MEC tridimensional, y constituyen los tejidos conectivos adyacentes al epitelio. Estas células, a diferencia de las anteriores, no

están polarizadas, carecen de uniones intercelulares y, por tanto, pueden moverse individualmente y atravesar la MEC (112).

La cadherina E (ECAD) es una proteína transmembrana que se localiza en las uniones adherentes y en la membrana basolateral de las células epiteliales, y se encarga de mantener la polaridad celular y la estructura. El dominio extracelular de ECAD media interacciones homotípicas dependientes de calcio con las células adyacentes. Su dominio intracelular se une a otras proteínas del citoplasma, las cateninas, que a su vez están conectadas con el citoesqueleto de actina. Las uniones estrechas se localizan justo encima de las uniones adherentes en el lado apical de la membrana basolateral (114). Las células mesenquimales tienen una morfología más alargada, denominada fibroblastoide, con asimetría anteroposterior, que facilita su motilidad. Las extensiones en el frente de estas células están enriquecidas con receptores de integrinas que interaccionan con la MEC, y contienen también metaloproteasas de matriz (MMPs; *Matrix Metalloproteinases*) que digieren la membrana basal y promueven la invasión. Además de disolver las uniones intercelulares e inhibir las proteínas epiteliales, la progresión hacia un fenotipo mesenquimal va acompañada de un aumento de proteínas como VIM, una proteína de los filamentos intermedios, que está asociada con un fenotipo celular altamente invasivo (115).



**Figura 3.** Esquema del proceso de TEM. Las células pasan de un fenotipo epitelial polarizado e inmóvil a un fenotipo mesenquimal móvil, atravesando estadios intermedios del proceso en los que se coexpresan marcadores epiteliales y mesenquimales. Para cada fenotipo se mencionan los principales marcadores.

Imagen adaptada de Kalluri y Weinberg (116).

## 2.2 TEM y su papel en la progresión tumoral.

La TEM ocurre durante el desarrollo embrionario o como respuesta fisiológica al daño y cicatrización de heridas, pero es también un proceso importante en la progresión tumoral y otras patologías que implican la degeneración de órganos, como la fibrosis. A nivel celular, la TEM patológica es muy similar al proceso fisiológico, ya que responde a vías de señalización reguladores, y moléculas efectoras similares (113). Durante unas reuniones de consenso sobre TEM celebradas en Polonia en el año 2007 y en los Laboratorios de Cold Spring Harbor en



2008, se propuso clasificar la TEM en 3 subtipos diferentes, basándose en el contexto biológico en el que tiene lugar, y en los biomarcadores que se expresan. La TEM de tipo I tiene lugar en procesos del desarrollo como son la implantación, embriogénesis y organogénesis, la TEM tipo II tiene lugar en procesos de regeneración tisular y fibrosis, y la tipo III es la TEM implicada en la progresión tumoral (117).

Para la mayoría de carcinomas, la progresión hacia la malignidad va acompañada de una pérdida de la diferenciación epitelial y un cambio hacia un fenotipo mesenquimal. Adoptando este fenotipo, las células tumorales pueden infiltrar tejidos adyacentes, atravesar barreras endoteliales, y acceder al torrente circulatorio a través de vasos sanguíneos y linfáticos (115). Como se ha mencionado anteriormente, el cáncer de ovario se disemina principalmente por la cavidad peritoneal formando nódulos en la superficie de órganos adyacentes como el omento, los intestinos, el bazo y la vejiga (118). Para formar las metástasis, las células de la ascitis tienen que desprenderse del tumor primario y evadir la muerte celular programada (anoikis). Tanto la agregación celular como la TEM son estrategias para evadir la anoikis (119).

Las TEM tipo III tienen lugar en células neoplásicas que han sufrido alteraciones genéticas y epigenéticas en oncogenes y/o genes supresores de tumores (GST), y se especula que este tipo de mutaciones podría hacer a estas células más sensibles a las señales inductoras de TEM (116). Las células mesenquimales generadas por la TEM tipo III pueden invadir y metastatizar a través de la circulación generando de esta manera manifestaciones de la progresión tumoral.

Muchos estudios *in vitro* en cultivos celulares e *in vivo* en modelos de ratón han demostrado que las células de un carcinoma pueden adquirir un fenotipo mesenquimal y expresar marcadores asociados al mismo como  $\alpha$ -SMA, FSP-1, VIM y desmina (120). Las células mesenquimales individuales derivadas de un tumor epitelial tras una TEM son muy difíciles de diferenciar de las células del estroma o de fibroblastos asociados al tumor. En tumores colorrectales se han descrito pequeños agregados de células tumorales disgregándose del tumor y extendiéndose hacia el estroma adyacente (121). Estas células normalmente se localizan en el frente invasivo del tumor primario y son consideradas las desencadenantes del proceso de invasión y metástasis. Algunos trabajos han demostrado que Snail se expresa de manera específica en el frente invasivo en tumores colorrectales (122) y estas células presentan también BCAT nuclear y pérdida de expresión de ECAD (123). Otros trabajos en concordancia con estos, muestran la presencia de Snail en el núcleo celular de tumores mamarios, gástricos y endometriales (124).

La expresión de Snail y Slug, principales inductores de la TEM, parece estar relacionada con la recaída y la supervivencia en pacientes con cáncer de mama, colon y ovario, lo que indicaría que la TEM está relacionada con un peor pronóstico. De hecho, varios estudios demuestran que la TEM puede estar asociada con parámetros clinicopatológicos de malignidad, como el mayor grado histológico y subtipos más agresivos (113). En cáncer de ovario, Snail y Slug se han asociado con fenómenos de resistencia a quimioterapia y radioterapia *in vitro*, y se relacionan con resistencia a la apoptosis inducida por *TP53* y acompañada por la expresión de marcadores de células madre del cáncer (CSC; *Cancer Stem Cells*) (118, 125). Kajiya y colaboradores han demostrado una relación entre la resistencia a paclitaxel en líneas celulares de CO y la adquisición de marcadores de TEM con un mayor potencial metastásico (126).

Si bien se considera que la TEM facilita el proceso de diseminación metastásica, hay que apuntar que existe cierta controversia, especialmente a nivel anatomopatológico, sobre si la transformación de una célula normal en una célula cancerosa o de una célula no invasiva en una célula metastásica es realmente una TEM, especialmente porque algunas metástasis tienen una histología muy similar al tumor primario del que derivan. Esta similitud en la histología del tumor secundario con el tumor de origen, indicaría que las metástasis mediadas por un proceso de TEM deben ser seguidas por un proceso de TME que permita la colonización de la metástasis en el nuevo órgano (123). Este proceso fue demostrado en un modelo *in vivo* de cáncer de piel que formaba metástasis en pulmón tras un proceso reversible de TEM/TME inducido por Twist (127).

### 2.3 Mecanismos moleculares de la TEM.

En el proceso de TEM están implicados varios mecanismos moleculares que incluyen la activación de factores de transcripción, la expresión de proteínas específicas de superficie, reorganización y expresión de proteínas del citoesqueleto, producción de proteínas para la degradación de la MEC y cambios en la expresión de miRNAs específicos (116). Aunque las vías de señalización implicadas en la TEM tipo I y tipo II son bien conocidas, las señales específicas que inducen la TEM tipo III aún no están esclarecidas. Las señales emitidas por el estroma tumoral (HGF, EGF, PDGF y TGF- $\beta$ ) parece que son las responsables de la activación en las células tumorales de los factores de transcripción inductores de TEM Snail, Slug, ZEB1, Twist, Goosecoid y FOXC2 (116). Twist, Goosecoid y FOXC2 juegan un papel importante en la formación de metástasis (128).

### 2.3.1 Reguladores de la TEM.

La pérdida de marcadores epiteliales y la adquisición de características mesenquimales se consigue mediante un complejo programa de transcripción en el que participan tres familias de factores de transcripción: SNAIL (Snail y Slug), ZEB (Zeb1 y Zeb2), y los factores de conformación básica hélice-lazo-hélice (bHLH; *basic Helix-Loop-Helix*) (Twist, E12 y E47) (129) .

Los factores de transcripción de dedos de zinc SNAIL, son importantes reguladores de la TEM y también modulan la expresión de genes implicados en la polaridad celular, la apoptosis, la supervivencia, la regulación inmunológica y la biología de CSC, bien de manera directa o indirecta (118). Los factores SNAIL son inducidos de manera directa a través de la vía Smad de TGF- $\beta$ , que se comentará más adelante. Entre los genes inhibidos por las proteínas SNAIL se encuentran los marcadores epiteliales ECAD, citoqueratina 18, desmoplaquina, MUC1, claudina y ocludina, y entre los genes regulados positivamente están aquellos que codifican para proteínas relacionadas con un fenotipo mesenquimal como las MMPs, VIM y fibronectina (FN) (130-132). Existen varias evidencias que relacionan los papeles de los factores SNAIL con la ejecución del programa de TEM. Así, se ha visto como la expresión ectópica de *SNAI1* (Snail) y *SNAI2* (Slug) suprime la expresión de ECAD y placoglobina (PKGB) y promueve la expresión de VIM y FN dando lugar a un fenotipo de TEM mientras que el silenciamiento de *SNAI1* tiene el efecto opuesto (133-136).

En vertebrados se conocen dos factores de transcripción de la familia ZEB: Zeb1 y Zeb2. Estos factores de transcripción son activados por la vía de señalización de TGF- $\beta$  e interaccionan con Smad3 reprimiendo la expresión de genes epiteliales, probablemente reclutando al co-represor CTBP (137, 138).

La familia de los factores de transcripción bHLH controlan diversos procesos del desarrollo y procesos patológicos (130). Estos factores de transcripción se dividen en tres clases: las proteínas de clase I E12 y E47, las proteínas de clase II Twist, y las proteínas de clase III, IDs (*Inhibitor of DNA binding*). Todas ellas están implicadas en el proceso de TEM, reprimen la expresión de la ECAD a través de diferentes mecanismos y promueven la migración y la invasión (130, 139-141).

### 2.3.2 Regulación de la Cadherina E.

En los tumores humanos las mutaciones genéticas en el gen de la ECAD son poco frecuentes. En cáncer de mama y en cáncer gástrico, se han descrito mutaciones en la línea germinal del locus de ECAD, con la consiguiente pérdida de expresión y/o función proteica (142, 143). En los últimos años, se han puesto de manifiesto diferentes modificaciones

epigenéticas como la hipermetilación de la región promotora del gen de la ECAD y mecanismos de acetilación/desacetilación de histonas que se han asociado con la pérdida de expresión de ECAD en distintos tipos de carcinoma (144-146). En la mayoría de los casos la regulación de la ECAD está mediada por mecanismos de represión transcripcional que veremos más adelante.

Un evento clave en la TEM es el intercambio en la expresión de ECAD por cadherina N (NCAD), lo que se conoce como el *switch* de cadherinas. Las células que están en proceso de una TEM experimentan una disminución en la expresión de ECAD y un aumento de NCAD, lo que promueve la interacción con componentes del endotelio y del estroma. Los inhibidores de ECAD se pueden clasificar en dos grupos dependiendo de sus efectos en el promotor del gen. Los factores SNAIL, ZEB y E47 se unen directamente al promotor de *ECAD* reprimiendo su actividad (130), mientras que factores como Twist, Goosecoid, E2.2 y FOXC2 reprimen la transcripción de manera indirecta (120). Además, estos represores de ECAD pueden modificar la polaridad de las células epiteliales y la división celular, así como promover la supervivencia celular (130). A pesar de que el término “intercambio” normalmente se refiere a un intercambio en la expresión de ECAD a NCAD, en ocasiones también puede hacer referencia a situaciones en las que los niveles de ECAD no varían, pero sí se produce un aumento en la expresión de NCAD (147).

La ECAD se expresa en la mayoría de tejidos epiteliales normales, y muchos carcinomas presentan una reducción o ausencia de su expresión (133, 134). Adicionalmente, muchos carcinomas sobreexpresan NCAD, propia de células mesenquimales, y esta sobreexpresión está relacionada con un aumento en la motilidad e invasividad en cáncer de mama y en carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC) (148, 149). En el caso del ovario, la superficie epitelial normal expresa NCAD, pero no ECAD, y durante la progresión hacia un fenotipo maligno, las células muestran una disminución en la expresión de NCAD y un aumento en la expresión de ECAD y cadherina P (PCAD) (150, 151). Además, Davidson y colaboradores, estudiando muestras pareadas de tumor primario y ascitis, vieron una expresión reducida de ECAD en el tumor en comparación con el fluido ascítico. Estos datos indican que la ECAD podría jugar un papel importante en los estadios iniciales de la carcinogénesis ovárica (152).

### 2.3.3 Inductores de la TEM y vías de señalización.

La gran mayoría de las vías que inducen la TEM convergen en la inducción de represores de la ECAD y, en particular, de los genes SNAIL (113). También hay experimentos que demuestran el papel de la hipoxia, la inflamación y el estrés oxidativo como inductores de la TEM, demostrando la importancia del microambiente tumoral en la activación de este

proceso (153). Entre las vías de señalización más importantes en la TEM cabe destacar las siguientes:

#### Vía TGF- $\beta$ .

TGF- $\beta$  es una citoquina implicada en diferentes procesos como proliferación, migración y apoptosis. Se une a dos receptores serina/treonina kinasa denominados tipo I y tipo II, que forman un heterotetrámero con un receptor tipo I y dos receptores tipo II. Mediante la unión de TGF- $\beta$ , los receptores tipo I fosforilan a Smad 2 y 3, que forman un complejo con Smad4 y se translocan al núcleo donde activan los genes SNAIL (154). Además, la vía de Smad coopera con las vías de Ras, Notch y Wnt en la inducción de la expresión de SNAIL y en el desarrollo del tumor y la formación de metástasis (134). Las vías no-Smad activadas por TGF- $\beta$  son Rho/GTPasa, PI3K/Akt y MAPK (155). La activación de estas vías está implicada en distintos procesos como la reorganización del citoesqueleto, crecimiento celular, supervivencia, invasión y migración (156).

Las células tumorales a menudo aumentan su producción de TGF- $\beta$  y esto no sólo activa la TEM y permite a las células ser más invasivas, sino que también promueve otros procesos como la angiogénesis en zonas próximas al microambiente tumoral, proveyendo así una ruta de escape para las células mesenquimales migratorias y facilitando la formación de metástasis (157). TGF- $\beta$  se sobreexpresa en distintos tipos de cáncer como carcinoma de células basales, melanoma y cáncer colorrectal (158-160). En cáncer de ovario se expresa en células tumorales y del estroma tumoral, y raramente en la superficie de tejido sano (161).

#### Vías de los receptores tirosina kinasa (RTK).

Esta vía es activada por la unión de los factores de crecimiento HGF, FGF, EGF y PDGF a RTK específicos de membrana. Estos receptores presentan un dominio kinasa intercelular que se activa, por fosforilación, tras la unión del ligando. Tras la activación, se activan GTPasas como Ras, Rac y Rho, que a su vez van a activar la vía de MAPK y PI3K, que conllevan a la activación de la transcripción de *Snail* (162, 163). La activación de los RTK puede activar otras vías como la de Src, una tirosina kinasa cuya actividad catalítica es necesaria para romper los contactos intercelulares mediados por cadherinas (164).

- EGF induce la TEM a través de la unión a su receptor EGFR. EGFR se expresa en el 70% de los tumores malignos de ovario y está relacionado con una histología serosa, con un peor pronóstico y con resistencia a quimioterapia (165, 166). En los últimos años se han desarrollado varios inhibidores de EGFR que han mostrado beneficios clínicos como gefitinib, erlotinib y lapatinib, y también anticuerpos monoclonales como

cetuximab (167, 168). En el tratamiento de cáncer de ovario, estos compuestos han tenido malos resultados en términos de respuesta clínica, pero su uso en combinación con inhibidores de PI3K ha mostrado resultados prometedores en ensayos preclínicos (169). Ahmed y colaboradores demostraron que la estimulación de células de epitelio ovárico normal con EGF adquirirían una morfología fibroblastoide. Demostraron también mayor movilidad celular en ensayos de surco y aumento en la expresión de MMP2 y MMP9 (170).

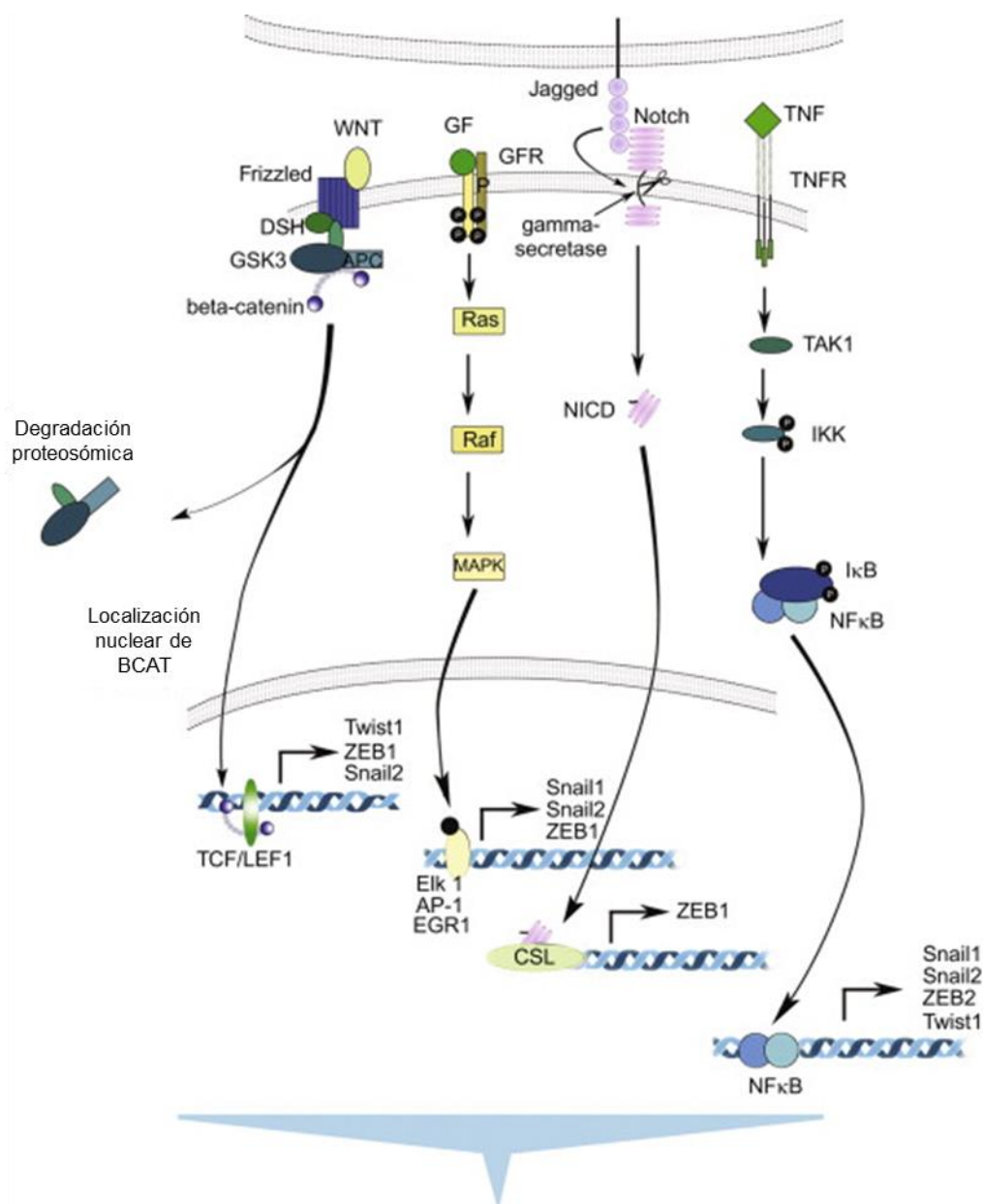
- HGF es un factor derivado de estroma que activa varias vías de señalización como MAPK, PI3K y AKT (171). Se han encontrado altos niveles de HGF en quistes malignos y líquido ascítico de mujeres con carcinoma de ovario (172), y su receptor cMET está sobreexpresado en muchos casos (173).

#### Vía Wnt.

Las proteínas Wnt secretadas no inducen la TEM *per se*, sino que lo hacen a través de su vía de señalización canónica, que coopera con la vía de TGF- $\beta$  en algunos tejidos (174). La vía canónica de TGF- $\beta$  está mediada por la BCAT, un componente de las uniones adherentes que conecta la ECAD con el citoesqueleto. En ausencia de señalización de Wnt, GSK3- $\beta$  fosforila la BCAT y la deja marcada para ser ubiquitinizada y posteriormente degradada, manteniendo bajos los niveles en el citoplasma (175). La activación de la vía Wnt inhibe la GSK3- $\beta$ , lo que conlleva a una acumulación citoplasmática de BCAT y permite la formación de complejos de BCAT con TCF/LEF, dos factores de transcripción que se translocan al núcleo y regulan la transcripción de genes diana en respuesta a ligandos de Wnt (175).

#### Vía Notch.

La señalización por la vía de Notch contribuye a la TEM tanto en la progresión tumoral como en el desarrollo cardíaco. Esta vía se activa cuando uno de sus receptores (Notch 1-4) se activa por unión a su ligando Delta-like o Jagged (174). Tras la activación, el receptor se proteoliza y libera un fragmento que se transloca al núcleo, donde activa dos mecanismos que actúan de manera sinérgica para regular la expresión de Snail (176, 177). En primer lugar, Notch induce la sobreexpresión de Snail por unión directa a su promotor, y, en segundo lugar, induce el reclutamiento de HIF1- $\alpha$  al promotor del gen *LOX* y elevando los niveles de hipoxia inducidos por LOX, que estabiliza a Snail y lo protege de la degradación (178).



#### Programa de TEM

Pérdida de marcadores epiteliales	Ganancia de marcadores mesenquimales
Cadherina E Ocludina ZO-1 Desmoplakinas Claudinas Desmogleinas	Vimentina Cadherina N A-SMA Fibronectina Tenascina

**Figura 4.** Esquema de las principales vías de señalización implicadas en el proceso de TEM. Adaptada de Gheldof y Berx (179).

### 3. MODELOS PARA EL ESTUDIO DE CÁNCER DE OVARIO.

Uno de los mayores desafíos en la investigación del cáncer es la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares que están implicados en su desarrollo. Para su estudio, se han desarrollado diferentes modelos, tanto en líneas celulares (*in vitro*) como en animales (*in vivo*), que comentaremos a continuación.

#### 3.1 Modelos *in vitro*.

##### 3.1.1 Cultivo primario vs. líneas establecidas.

Los modelos de cultivo celular son los más utilizados a nivel de laboratorio y han proporcionado gran cantidad de información y diferentes herramientas para la comprensión del cáncer. Actualmente, gracias a los avances en la biología celular, disponemos de modelos mucho más complejos que son capaces de representar de manera más fehaciente la realidad de los tumores *in vivo* y muchos de los mecanismos que dan lugar al desarrollo de la enfermedad (180). Los principales estudios sobre cáncer se han realizado principalmente en cultivo primario o líneas celulares establecidas, ambos derivados de pacientes.

El cultivo celular primario se obtiene a partir de explantes de tejidos u órganos o a partir de biopsias tumorales. También se puede establecer a partir de suspensiones celulares como líquido cefalorraquídeo, ascitis o efusión pleural. Al establecerse el cultivo, se pierden las interacciones celulares y las interacciones célula-MEC, pero las células suelen conservar su capacidad proliferativa durante un número finito de pases (181). La principal ventaja del cultivo primario es que representa, durante los primeros pases, las características del tumor del cual han sido obtenidos, y permiten realizar un primer cribado farmacológico en la búsqueda de un tratamiento personalizado. Las desventajas de estos modelos radican en las dificultades que pueden darse a la hora de obtener material para estudios posteriores y en el número finito de pases que se pueden dar al cultivo antes de que se pierda la heterogeneidad de la población celular y se desarrollen resistencias adquiridas (182).

Las líneas celulares no son inmortales, y el número de pases que pueden aguantar depende de cada línea. Llegado este momento, las células dejan de proliferar y entran en senescencia. Algunos tipos celulares, como las células tumorales, tienen mecanismos que les permiten evitar este proceso de senescencia, y pueden dar lugar a líneas establecidas que crecen de manera casi indefinida. Este proceso puede darse de forma espontánea, puesto que durante el proceso de cultivo, las células son sometidas a una presión selectiva, y aquellas con mayor tasa de crecimiento acaban predominando sobre el resto (183). Alternativamente se



puede conseguir la inmortalización mediante la exposición a agentes cancerígenos (radiaciones o agentes químicos) que favorecen la mutación espontáneamente, o mediante infecciones víricas o transfecciones con ADN exógeno (181, 184). El mayor inconveniente de estos modelos es que no representan los estadios iniciales de la enfermedad y que, a lo largo de los pases, van acumulando alteraciones fenotípicas y genéticas que resultan en perfiles de expresión y características histopatológicas que pueden ser diferentes a las del tumor original (182, 185, 186).

A pesar de estos inconvenientes, los modelos celulares para el estudio de cáncer son una buena aproximación para comprender mejor el proceso tumoral, y pueden convertirse en una técnica de alto rendimiento para la búsqueda e identificación de biomarcadores y dianas terapéuticas, y para el estudio de sus mecanismos de acción (187).

### 3.1.2 Análisis *in vitro* de proliferación, apoptosis, ciclo celular, migración e invasión.

El cultivo *in vitro* permite determinar el efecto de un fármaco sobre las células. Para ello, podemos evaluar la proliferación celular, la apoptosis, o el balance entre ambas, que sugiere el crecimiento del tumor o la regresión del mismo. Los métodos disponibles para ello van desde ensayos simples en los que se puede determinar el número de células vivas y muertas por exclusión de colorantes como azul tripán, a otros ensayos en los que se determina la viabilidad de forma indirecta, por la capacidad celular de reducir compuestos como sales de tetrazolio (XTT y MTT), sulforrodamina B (SRB), o azul alamar, o bien mediante la generación de ATP (adenosina trifosfato). La principal ventaja de estos métodos es que permiten realizar estudios de forma rápida en el formato de 96 pocillos, pudiendo utilizar múltiples compuestos o diluciones de los mismos, y siendo, por tanto, óptimos para estudios a gran escala. Por todo ello, hemos asistido en los últimos años a un gran desarrollo de kits comerciales para facilitar estas determinaciones (188, 189).

Otros métodos se centran en la evaluación directa de la síntesis de ADN mediante citometría de flujo, bien por incorporación de nucleótidos marcados con BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina), o bien mediante el estudio de las fases del ciclo celular con el agente intercalante yoduro de propidio (IP) (190).

Otro de los ensayos estándar para medir el potencial efecto de los fármacos, es el potencial clonogénico. Este ensayo mide el porcentaje de células de una población capaz de dar lugar a clones, y, por tanto, midiendo el efecto de un compuesto sobre la población proliferativa en cuanto a cantidad y tamaño de colonias (189).

Además de los estudios de proliferación, ciclo celular y apoptosis, el cultivo celular permite llevar a cabo estudios sobre la capacidad de migración e invasión de las células. La migración celular es un proceso que tiene lugar en muchos eventos fisiológicos y patológicos. En la progresión tumoral, la adquisición de un fenotipo migratorio normalmente coincide con el cambio a un fenotipo maligno (191). Dicho fenotipo, normalmente se adquiere bien por invasión local o infiltración del tejido adyacente, como sucede en el caso del glioblastoma (192) o en CECC (193), o bien por la colonización de tejidos distantes como se da en las metástasis de cáncer de mama en hueso, pulmón, hígado o cerebro (194). En todos los casos, los pasos esenciales para la invasión y la diseminación del tumor incluyen cambios en la adhesión a los componentes de la MEC o en la adhesión intercelular, un aumento de la movilidad celular que conlleva cambios en el citoesqueleto de actina y la invasión del tejido adyacente mediante la degradación proteolítica de la MEC (192). Para el estudio de la migración, los métodos más utilizados son los ensayos de surco (*wound healing assays*) (195) o insertos con membranas permeables (*transwell assays*) que permiten la movilidad de las células de un compartimento al otro. En los casos de invasión, la membrana permeable estaría recubierta de algún tipo de MEC (Matrigel, colágeno, laminina) que las células tienen que atravesar (180).

**Tabla 2.** Principales ventajas e inconvenientes del cultivo *in vitro*.

Ventajas	Inconvenientes
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Control preciso de las características físico-químicas y fisiológicas del medio de cultivo.</li> <li>- Multitud de ensayos disponibles para estudio de procesos celulares.</li> <li>- La homogeneidad del cultivo facilita la obtención de réplicas y el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos.</li> <li>- Modelo económico: necesita menor concentración de los fármacos y garantiza el acceso directo de las sustancias a las células.</li> <li>- Evita las cuestiones éticas planteadas en el uso de muestras de procedencia humana y sobre los modelos animales.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- El cultivo celular ha de realizarse en condiciones de asepsia para evitar contaminaciones.</li> <li>- La inestabilidad genética, como consecuencia de la aneuploidía, puede provocar diferencias significativas de una generación a la siguiente.</li> <li>- Validez del modelo <i>in vitro</i>: las células se desdiferencian del tejido de procedencia. Además, hay una pérdida de la heterogeneidad celular, de la organización tridimensional y de las interacciones celulares y carencia de componentes sistémicos de regulación.</li> </ul>

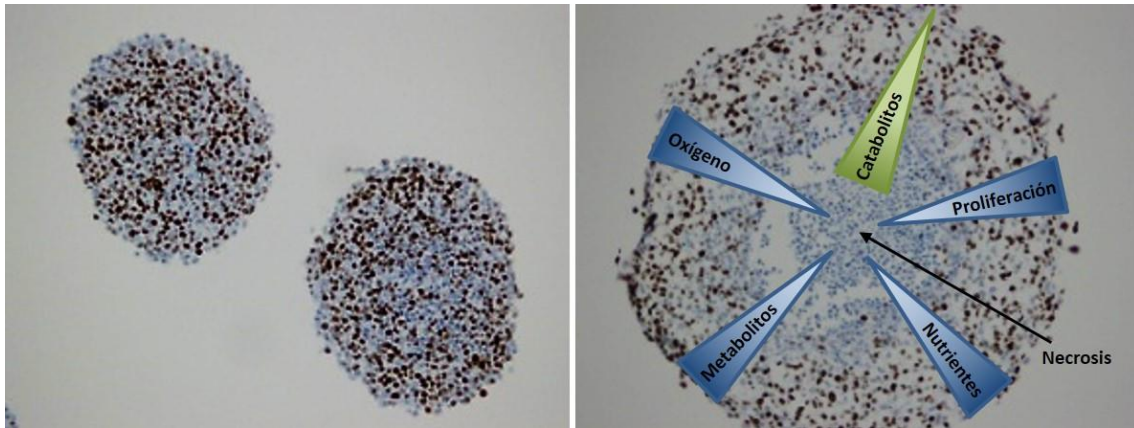
Por tanto, el cultivo *in vitro* representa un buen modelo para el estudio del cáncer ya que hay mucha información disponible, es un modelo rápido, fácil, barato y manipulable genéticamente. No obstante, el mayor inconveniente viene representado por la pérdida de la arquitectura tisular y la ausencia del microambiente tumoral en la placa. Este hecho hace que

el modelo sea muy limitado ya que no mimetiza correctamente la situación real del tumor. Por este motivo, se han desarrollado sistemas de cultivo celular en tres dimensiones (3D) que proporcionan un microambiente más apropiado para el estudio de la carcinogénesis (196), que analizaremos a continuación. Las principales ventajas e inconvenientes del cultivo celular se resumen en la Tabla 2.

### 3.1.3 Cultivo en 3D.

Los tumores sólidos crecen en una conformación espacial, que resulta en una exposición heterogénea al oxígeno y los nutrientes y a otros tipos de estrés físico y químico como puedan ser la hipoxia y la modificación de los mecanismos de señalización. Por tanto, el cultivo en 3D mimetiza mejor la arquitectura tumoral que el cultivo tradicional en monocapa o en dos dimensiones (2D) (197). Los sistemas de cultivo en 3D permiten representar algunos factores importantes en el desarrollo del cáncer, como las interacciones intercelulares, las interacciones célula-MEC, los gradientes de oxígeno y nutrientes y la polaridad celular, carentes en los cultivos en 2D (198, 199). El aumento de dichas interacciones puede aumentar la diferenciación celular, cambiar los mecanismos de señalización en respuesta a componentes de la MEC, modificar los patrones de expresión génica y alterar la expresión de proteínas, como las implicadas en adhesión: cadherinas e integrinas (200).

Los gradientes de oxígeno y nutrientes hacen que en los esferoides de un determinado tamaño (más de 300  $\mu\text{m}$  de diámetro) se formen zonas de proliferación diferencial, obteniéndose zonas heterogéneas de células proliferantes, células quiescentes, células que están muriendo y un núcleo de células necróticas, que se asemeja más a lo que ocurre en el tumor *in vivo* (197, 201). Al igual que sucede en los tumores, las distintas zonas exhiben diferentes sensibilidades a fármacos antitumorales (199, 202). El crecimiento de las líneas tumorales en 3D induce la morfología e histología reminiscente del tumor original, por lo que el cultivo tridimensional puede utilizarse para estudiar la morfología del tumor y compararla con la de otras líneas celulares. Además, los agregados tridimensionales pueden ser cultivados durante periodos de tiempo más largos, de hasta 4 semanas, en comparación con una semana en cultivos en monocapa, lo que podría ser más apropiado para estudios de supervivencia y estudios que quieran demostrar efectos a medio plazo de los fármacos (203). Por tanto, los cultivos en 3D suponen un enlace práctico entre el cultivo tradicional y los modelos *in vivo* (204). En 1971, Sutherland y colaboradores fueron los primeros en aplicar el cultivo en 3D en la investigación contra el cáncer, en un modelo de cáncer nodular (205).



**Figura 5.** Imágenes de inmunohistoquímica (IHQ) con el marcador de proliferación celular ki-67 realizadas sobre esferas cultivadas durante 4 (izquierda) y 7 (derecha) días.

Uno de los campos de estudio más interesantes del cultivo en 3D es la evaluación de fármacos en células tumorales. Los estudios descritos para el cultivo en 2D se pueden llevar a cabo también en 3D. Hay trabajos que demuestran que las células son más resistentes a los fármacos cuando crecen en 3D que cuando lo hacen en 2D (200). Esto se ha descrito en líneas celulares de adenocarcinoma ductal de páncreas, más resistentes a gentamicina (206), en líneas de cáncer de pulmón, a bortezomib (207) y en cáncer de mama a 5-fluorouracilo (5-FU) (208). En cáncer de ovario, la línea celular SKOV3 forma agregados celulares resistentes a paclitaxel (209), y muestra una mayor supervivencia tras el tratamiento cuando las células han sido cultivadas en 3D en comparación con las cultivadas en 2D (210). De manera similar, al cultivar en 3D células madre aisladas de la línea celular SKOV3 en un ambiente con extractos de MEC, estas células se mostraban resistentes a docetaxel, cisplatino (CDDP), carboplatino y 5-FU (211).

En los modelos tridimensionales también se pueden llevar a cabo estudios de migración e invasión. En este tipo de experimentos, los esferoides cultivados pueden ser embebidos en distintos tipos de matrices o trasladados a placas que están pre tratadas con distintos componentes de MEC, y se observa la capacidad que tienen las células de invadir o crecer en dichas superficies (201, 212). Existen matrices específicas de tejido que constituyen un ambiente favorable para la migración y formación de metástasis de las células tumorales. Por ejemplo, se ha descrito una línea de CECC resistente a inhibidores de EGFR como más agresiva y con una mayor movilidad sobre diferentes proteínas que componen la MEC que la variable sensible de la misma línea celular (191). La hipoxia es un factor microambiental frecuente que puede inducir los procesos de migración e invasión y favorecer los fenómenos de resistencia a fármacos. Esto se ha comprobado en líneas celulares de CECC, donde las

células migran más sobre una matriz de colágeno en condiciones de hipoxia que en condiciones de normoxia, y muestran una resistencia diez veces superior al CDDP (191).

Uno de los estudios más completos en CO utilizando cultivo en 3D fue desarrollado por Lee y colaboradores en 2013. Analizaron las diferencias en el cultivo en 2D y 3D de 31 líneas celulares diferentes derivadas de tumores primarios, metástasis o ascitis. Dicha comparación indicaba que las células cultivadas en 3D conservaban las características histológicas del tumor primario y las células en 2D no lo hacían. Encontraron diferencias en la expresión de biomarcadores entre los cultivos en 2D y 3D, y determinaron que las células cultivadas en 3D exhibían diferentes grados de proliferación y eran más resistentes a CDDP y paclitaxel. Por tanto, los resultados indicaron que los cultivos 3D eran un modelo más representativo de la biología del CO (213).

Los cultivos en 3D tienen también una serie de limitaciones. La primera y más importante es la ausencia de vasculatura, un componente clave en los tumores *in vivo* que promueve la formación de metástasis (214, 215). Adicionalmente, a pesar de mantener la estructura tridimensional y las interacciones intercelulares, el cultivo en 3D sigue sin reflejar la interacción del tumor con el microambiente que lo rodea y carecen también de las células que median la respuesta inmune adaptativa (216). Además, estos modelos están limitados en cuanto a los intervalos de tiempo que pueden ser mantenidos y no permiten el desarrollo de estudios a largo plazo. Finalmente, los modelos que requieren células humanas primarias están limitados por la disponibilidad de las mismas (217). No obstante, el rápido desarrollo de los modelos tridimensionales, está dando lugar a múltiples estudios de co-cultivo, que intentan representar el microambiente tumoral y permiten mimetizar los diferentes tipos de heterogeneidad celular observados en diferentes contextos *in vivo*. Sistemas en 3D más complejos que combinan células tumorales con células del estroma pueden ofrecernos información relevante sobre la importancia de la comunicación entre distintos tipos de células (218, 219). Uno de los estudios más completos sobre los eventos iniciales de la formación de metástasis, fue el realizado por Kenny y colaboradores. Desarrollaron un modelo organotípico de cultivo 3D para intentar reproducir el microambiente tumoral presente en el omento y el peritoneo. Este modelo estaba compuesto por células del mesotelio y fibroblastos provenientes del omento, y proteínas de MEC. Sobre estas células, se añadían distintas líneas celulares de CO. Observaron que, mientras el 60%-80% de las células se adherían, sólo el 18%-25% eran capaces de invadir la matriz, y la mayor invasividad se conseguía cuando la matriz contenía colágeno. Observaron también que los fibroblastos y las células mesoteliales ejercían efectos opuestos; las células mesoteliales inhibían la adhesión e invasión celular mientras que los fibroblastos promovían ambos procesos (196).

### 3.2 Modelos *in vivo*.

Algunas de las carencias descritas para los modelos *in vitro* pueden ser resueltas mediante modelos *in vivo*, aportando datos sobre la interacción con el microambiente del huésped, pero sin olvidar que estos tampoco pueden recopilar al 100% lo que ocurre en el desarrollo del tumor humano.

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), y el ratón, *Mus musculus* (*M. musculus*), han sido los modelos animales más utilizados para el estudio del CO. Los estudios con estas especies han servido para dilucidar, entre otras, las bases moleculares de los mecanismos implicados en la formación de metástasis, que incluyen alteraciones en la adhesión celular, en la migración y en la expresión de genes del desarrollo implicados en el CO (220, 221). No obstante, al contrario que en humanos, ni las moscas ni las ratonas, desarrollan cáncer de ovario de manera natural (222). Esto podría estar relacionado con el hecho de que la mayoría de los mamíferos están normalmente en estado de gestación, de lactancia o en fases de anestro prolongadas en las que no se da la ovulación. Por tanto, los estudios traslacionales con estos animales presentan una serie de limitaciones. Existe un tercer modelo menos utilizado, en gallinas domésticas, *Gallus gallus domesticus* (*G. g. domesticus*), que sí desarrolla cáncer de ovario de manera espontánea (223).

Los ratones representan el modelo animal más utilizado para estudiar enfermedades humanas. Presentan las ventajas de tener ciclos reproductivos cortos y producir grandes camadas, tener una esperanza de vida de aproximadamente 3 años y ser manipulables genéticamente, además de fácilmente manejables y con un coste aceptable (224, 225). Adicionalmente, al conservar múltiples vías moleculares y fisiológicas similares a las de los humanos, su estudio ha permitido el desarrollo de múltiples herramientas de laboratorio para su modificación genética (226). Con el fin de crear mejores modelos preclínicos, se están desarrollando modelos PDX (*Patient Derived Xenograft*) (227). Estos modelos se crean trasplantando porciones de los tumores resecados de los pacientes en ratones inmunodeprimidos. A través de los PDX se han conseguido establecer modelos tumorales de melanoma, mama, páncreas, pulmón, colon y cerebro (228). Estos modelos han permitido la identificación de biomarcadores, la comprensión de procesos como la invasión celular o la angiogénesis, o bien la evaluación de la respuesta a fármacos (229-231). Los injertos de tumores de ovario muestran una histología, genética y fenotipo más similar al tumor original, manteniéndose a lo largo de varias generaciones (232, 233). También se ha demostrado que características como el crecimiento del tumor, la formación de metástasis o el desarrollo de ascitis en este modelo, son similares al del CO en mujeres (234). La respuesta al tratamiento

con platino en modelos PDX también ha mostrado correlación con el pronóstico de las pacientes en dos estudios independientes (235, 236). Pero tampoco hay que olvidar algunos inconvenientes de los modelos PDX, como que no son óptimos para el estudio de los eventos iniciales de la transformación tumoral, ni para el estudio del papel del sistema inmune, dado que las ratonas son inmunodeprimidas (237). Además, en el caso de los modelos PDX, el proceso de generación del modelo es bastante largo, entre 4 y 8 meses, y costoso, y en el caso de los pacientes de cáncer, no pueden esperar tanto tiempo a que se desarrolle su modelo (238).

La gallina doméstica, es el único modelo animal que, al igual que los humanos, desarrolla cáncer de ovario de manera espontánea, y, a pesar de las diferencias anatómicas, muestra una progresión de la enfermedad y una patología similar a la de los humanos metastatiza por la cavidad abdominal y forma ascitis (223, 239, 240). Confirmando la hipótesis de la ovulación incesante, Treviño y colaboradores consiguieron una reducción del 91% en la incidencia de CO en gallinas tratadas con el anticonceptivo hormonal progestina (241). Por tanto, la gallina representa un modelo único para el estudio de los mecanismos implicados en el comienzo, el desarrollo y la progresión del CO, siendo, el desarrollo espontáneo de la enfermedad, la principal ventaja de este modelo. No obstante, existe también un gran inconveniente, que radica en el hecho de que la gallina es una especie ovípara y, por tanto, su fisiología dista mucho de la de los humanos (223).

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## 1. HIPÓTESIS.

El cáncer de ovario es el más letal de los tumores ginecológicos, principalmente debido a que su diagnóstico se realiza en fases avanzadas de la enfermedad. Mientras que en el 90% de las pacientes afectadas de un cáncer de ovario en estadio inicial se llega a curar el tumor, solo el 30% de las pacientes en estadio avanzado de la enfermedad sobrevivirán más de 5 años tras el diagnóstico. El cáncer de ovario se disemina a órganos adyacentes principalmente a través de la cavidad peritoneal. Este patrón de diseminación hace que la cirugía con intención citorreductora sea difícil y, por ello, el tratamiento estándar debe ser completado con una terapia adyuvante basada en la administración de platino y taxanos. La respuesta a este tratamiento suele estar en torno al 70% de los casos, pero la mayoría de las pacientes experimentarán una recidiva. Por todo ello, es necesario profundizar en los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de esta enfermedad y su diseminación para poder establecer tratamientos más efectivos.

Son muchas las evidencias que sugieren que la adquisición de características invasivas en el cáncer de ovario va acompañada de la pérdida de algunas características epiteliales y la adquisición de otras mesenquimales. Este proceso, conocido como transición epitelio-mesénquima (TEM), aún no ha sido caracterizado de forma exhaustiva, aunque existen evidencias que indican su importancia en un abanico de procesos relacionados con la progresión tumoral, como son invasión, metástasis, resistencia a muerte celular, generación de resistencias al tratamiento, inmunosupresión y adquisición de características de pluripotencia. Estudios recientes sugieren la existencia de un subtipo molecular con características mesenquimales en el carcinoma de ovario con implicaciones pronósticas.

Para el estudio de este proceso es necesaria una caracterización rigurosa de los modelos *in vitro* disponibles, debido a la gran heterogeneidad conocida del cáncer de ovario. Los modelos en 3D mimetizan la estructura tridimensional de los tumores y, por ello, pueden ser modelos idóneos para la búsqueda de biomarcadores. La caracterización de los mismos en cuanto sus características basales, así como de expresión de genes relacionados con el proceso de TEM puede ser crucial en la búsqueda de biomarcadores relacionados con el cáncer de ovario, además de servir como base para estudios mecanísticos relacionados con los mismos.

## 2. OBJETIVOS.

### 2.1 Objetivo primario.

Caracterizar a nivel molecular el proceso de TEM en el carcinoma de ovario.

### 2.2 Objetivos secundarios.

En la serie de pacientes analizada:

- Analizar la expresión de moléculas relacionadas con el proceso de TEM en el carcinoma de ovario.
- Identificar perfiles de expresión génica relacionados con la TEM y pronóstico en el carcinoma de ovario.

En estudios *in vitro*:

- Establecer modelos celulares en dos y tres dimensiones para el estudio del carcinoma de ovario.
- Analizar las características basales de estos modelos en cuanto a proliferación, migración e invasión.
- Estudiar posibles biomarcadores relacionados con la TEM en estos modelos como base para la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. PACIENTES Y VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS.

El estudio de búsqueda de perfiles de expresión génica relacionados con TEM se realizó sobre muestras de 84 pacientes diagnosticadas de CO en estadio avanzado en el Hospital Universitario La Paz entre febrero de 1996 y diciembre de 2003. Se aplicaron los siguientes criterios para la inclusión de las pacientes en el estudio:

- Diagnóstico anatomopatológico de CO.
- Estadio III-IV según la clasificación FIGO.
- Disponibilidad de muestra parafinada con al menos un 80% de células tumorales sin zonas necróticas.
- Disponibilidad de una TC tóraco-abdominal al diagnóstico.
- Tratamiento consistente en cirugía citorreductora seguida de administración de quimioterapia con carboplatino-paclitaxel durante un mínimo de 6 ciclos.
- Seguimiento clínico durante, al menos, 36 meses desde la finalización del tratamiento.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz, siguiendo la normativa vigente.

Las variables clínicas y anatomopatológicas recogidas para realizar el estudio y la estratificación de los datos se enumeran a continuación:

- Edad al diagnóstico.
- Fechas de diagnóstico, comienzo del tratamiento, recaída y *exitus* o última visita, para el cálculo de las variables temporales SLP y SG. La SLP se definió como el tiempo transcurrido desde la fecha de inicio del tratamiento hasta la recaída o hasta la fecha de la última visita, en el caso de que no se produjera la recaída. La SG se definió como el intervalo de tiempo comprendido entre el inicio del tratamiento y la fecha del fallecimiento de la paciente o de la última revisión.
- Estadio de la enfermedad: estadio FIGO III ó IV.
- Tipo histológico: HGSOE frente al resto de tumores.
- Grado de diferenciación: bajo frente a alto.
- Cirugía realizada: citorreducción óptima frente a subóptima, con los criterios vigentes en el momento del estudio, es decir, tumor residual menor o igual a 1 cm para considerar la citorreducción óptima.
- Presencia de ascitis.

- Respuesta clínica obtenida según los criterios RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*): respuesta completa o parcial frente a progresión o estabilización de la enfermedad.
- Recaída.
- *Exitus*.

La respuesta a quimioterapia en cáncer de ovario puede valorarse de forma radiológica o bioquímica (mediante medición del biomarcador CA125). En este estudio se valoró únicamente la respuesta radiológica ya que no se disponía de la determinación de CA125 para todas las pacientes. Para la evaluación radiológica se emplearon los criterios RECIST 1.0, en los que se considera “respuesta parcial” a la disminución de al menos un 30% de la suma de los diámetros mayores de las lesiones tumorales, y “respuesta completa” a la desaparición de todas las lesiones visibles (242).

## 2. PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA.

### 2.1 Selección de genes.

Teniendo en cuenta el principal objetivo del estudio se seleccionaron un total de 43 genes relacionados con el CO implicados fundamentalmente en la TEM en distintos tipos tumorales. Se buscaron las secuencias de referencia para cada uno de ellos en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), mediante el código *Unigene*. Sobre la secuencia de referencia, se seleccionaron sondas específicas para cada uno de los genes en estudio, así como para los genes de referencia, mediante el software *Taqman Gene Expression Arrays* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Con dichas sondas se configuraron las tarjetas microfluídicas (TLDA; *Taqman Low Density Array*) para realizar el análisis de expresión génica.

Los genes de referencia, también llamados control endógeno o *housekeeping* (HK), son aquellos cuya expresión, *a priori*, no varía de una muestra a otra, por lo que nos sirven para determinar si tenemos la misma cantidad de ARNm en las muestras analizadas. Al analizar muestras conservadas en parafina es necesario emplear más de un control para evitar errores que puedan surgir por la degradación del material (243). En un estudio previo, se analizó la expresión de 13 genes HK mediante el algoritmo geNorm (versión 3.4). Este programa realiza dos tipos de análisis: el primero, evalúa la estabilidad en la expresión de los genes seleccionados, y el segundo, valora el número idóneo de dichos genes cuya combinación es

más adecuada para el proceso de normalización. Se recomienda emplear un número mínimo de 3 genes normalizadores, los más estables, y añadir otros hasta que la inclusión de éstos no contribuya significativamente a la modificación del factor de normalización (244). En nuestro caso, se identificó la combinación de 5 genes HK (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB* y *18S*) como la más idónea para el proceso de normalización (245). Los 48 genes empleados en este estudio se muestran en la Tabla 3 y en la Tabla 1 del Anexo se detalla su descripción y los alias oficiales empleados.

**Tabla 3.** Genes relacionados con la TEM y genes control (\*) analizados en el estudio de expresión.

Símbolo del gen			
<i>ACTB*</i>	<i>GAPDH*</i>	<i>ITGB3</i>	<i>SLC39A6</i>
<i>AKT1</i>	<i>GSK3B</i>	<i>LOX</i>	<i>SNAI1</i>
<i>B2M*</i>	<i>GUSB*</i>	<i>LOXL2</i>	<i>SNAI2</i>
<i>CDH1</i>	<i>HGF</i>	<i>MET</i>	<i>SNAI3</i>
<i>CDH2</i>	<i>HIF1A</i>	<i>NEK2</i>	<i>SPARC</i>
<i>CDH3</i>	<i>ID1</i>	<i>PDK1</i>	<i>STAT3</i>
<i>CDH11</i>	<i>ID2</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>STAT5B</i>
<i>CTNNB1</i>	<i>ID3</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>TWIST1</i>
<i>CXCL12</i>	<i>ID4</i>	<i>PIK3R2</i>	<i>TWIST2</i>
<i>CXCR4</i>	<i>IL6R</i>	<i>PTK2</i>	<i>VHL</i>
<i>EPAS1</i>	<i>ILK</i>	<i>RNA18S5*</i>	<i>ZEB1</i>
<i>FRAP1</i>	<i>ITGB1</i>	<i>RPS6KB2</i>	<i>ZEB2</i>

## 2.2 Procesamiento de las muestras.

Las muestras tisulares se fijaron en formol al 10% y se incluyeron en parafina siguiendo los métodos convencionales aplicados en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz. De los bloques de parafina se obtuvieron secciones histológicas de 4 µm de espesor que, posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina. Todos los casos fueron revisados por un patólogo especialista para confirmar el diagnóstico y la presencia de, al menos, un 80% de células tumorales. Para el estudio molecular se obtuvieron entre 4-8 secciones adicionales de 4 µm de espesor.

El procesamiento posterior de las muestras se realizó siguiendo una serie de pasos que se describen a continuación: aislamiento del ARN total, síntesis del ADN complementario (ADNc), reacción de amplificación mediante RT-qPCR y medida de la expresión génica.

### 2.2.1 Aislamiento de ARN total.

El ARN total fue aislado mediante la utilización del kit *Masterpure RNA Purification* (Epicentre, Madison, WI, EE.UU.), específicamente diseñado para muestras parafinadas, siguiendo el protocolo de la casa comercial con mínimas modificaciones. La concentración y pureza del ARN total aislado se determinó mediante espectrofotometría en Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), midiendo la absorbancia a las longitudes 260 y 280 nm. La calidad del ARN fue determinada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El ARN total aislado se almacenó a -80°C hasta su utilización.

### 2.2.2 Síntesis del ADNc.

Para la síntesis de ADNc se utilizó el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), que permite convertir cuantitativamente desde 0,1 µg hasta 10 µg de ARN en ADNc, en un volumen de 50 µL. La síntesis de ADNc se realizó a partir 1 µg de ARN total de cada una de las muestras.

La reacción de transcripción reversa se llevó a cabo en un termociclador modelo *GeneAmp PCR System 2700* (Applied Biosystems), siguiendo el protocolo del kit. Los ADNc se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

### 2.2.3 Análisis de la expresión génica.

El análisis de la expresión génica por RT-qPCR se realizó con el sistema *Taqman Gene Expression Assays*. Una vez seleccionadas las sondas y cebadores para los genes de interés, se utilizó como soporte una tarjeta TLDA que permite el análisis de 384 pocillos. Cada tarjeta fue configurada para el análisis de 8 muestras, lo que permitía analizar los 48 genes (43 implicados en TEM y 5 HK). Los puertos de la tarjeta contenían 50 µl de *Taqman Universal PCR Master Mix* y 50 µl del ADNc correspondiente, cantidad equivalente a 1 µg del ARN total. Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en un termociclador ABI PRISM 7900 HT *Sequence Detection System* (Applied Biosystems).

La señal de fluorescencia aumenta de forma exponencial en cada ciclo de amplificación de la PCR. El ciclo de PCR en el que la fluorescencia alcanza un valor umbral de 10 veces la desviación estándar de la fluorescencia basal, es el que se toma como referencia para la medida cuantitativa. Este ciclo se denomina ciclo umbral o *threshold cycle* (Ct), y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de secuencia a amplificar. El Ct se calculó con el software SDS (versión 2.2) (Applied Biosystems).

Los valores crudos de Ct utilizados para la búsqueda de perfiles fueron sometidos a un proceso de normalización, empleando un factor en base a la media geométrica de los 5 HK seleccionados.

### 2.3 Análisis estadístico.

Todos los cálculos estadísticos se realizaron con los programas R Statistics (versión 3.2) y SPSS versión 15.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EE.UU.). En el análisis descriptivo de variables clínicas analizadas se recogen los datos cuantitativos como media (rango mínimo-máximo), y los datos cualitativos como frecuencias absolutas y porcentajes. Se analizó el efecto de cada una de las variables clínicas sobre la supervivencia mediante análisis univariantes.

En cuanto a los datos de expresión génica, se realizó en primer lugar un estudio de correlación entre cada una de las variables génicas, comparándolas una a una. Valores superiores a 0,25 (positivos o negativos) son indicativos de una correlación entre los genes y no permiten un análisis con métodos tradicionales ya que podrían incluir errores y problemas en la identificación de los efectos de las variables.

Para explorar si las variables génicas están relacionadas con el diagnóstico de HGSOc, se realizó un análisis univariante clásico y se aplicaron correcciones para comparaciones múltiples con el test FDR (*False Discovery Rate*) (246).

En los estudios de supervivencia se realizó un análisis univariante de cada gen mediante regresión de Cox (247). Se añadió el *Hazard Ratio* (HR) (con un intervalo de confianza (I.C.) del 95% y su p-valor) de cada gen como variable continua. Se consideraron “genes protectores” aquellos que se asociaban con un HR menor de uno, mientras que se consideraron “genes de riesgo” aquellos que se asociaron con un HR mayor de uno. Para la construcción de los modelos de supervivencia se utilizaron los métodos de regresión penalizada de Lasso (*Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*) y Boosting, considerados los más apropiados para el tamaño muestral y el tipo de muestras utilizadas (248, 249).

La precisión de cada modelo fue determinada mediante curvas ROC (*Receiver Operating Curves*), evaluándose a diferentes tiempos de interés: 6, 12, 24, 36, 48 y 60 meses. Para los modelos con la mejor capacidad predictiva, se realizaron también curvas de supervivencia de Kaplan Meier, estableciendo dos grupos de riesgo.



### 3. CULTIVOS CELULARES.

#### 3.1 Líneas celulares y mantenimiento.

Las líneas celulares de CO utilizadas provienen de la colección europea de cultivos celulares (ECACC; *European Collection of Cell Culture*). Todas crecen en monocapa adherente, fueron cultivadas a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>, y pasadas en relación 1:10 al alcanzar una confluencia aproximada del 90%. En la Tabla 4 se muestran las líneas celulares utilizadas con el tipo de tumor de origen y los medios de cultivo utilizados para cada línea.

Las líneas de superficie ovárica normal provienen del banco de células canadiense OvCaRe (*Ovarian Cancer Research*). Estas células, denominadas IOSE (*Immortalized Ovarian Surface Epithelium*) 120, IOSE386 e IOSE386, han sido parcialmente inmortalizadas con el plásmido SV40 T/t, y entran en senescencia alrededor del pase 20 al dividirse 1:5. Estas células se cultivaron a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>, en una combinación de medios 199 y MCDB105 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en relación 1:1, con 5% de suero fetal bovino (FBS) y 50 µg/ml de gentamicina.

#### 3.2 Cultivo en 3D.

Para el cultivo en 3D utilizamos placas de cultivo de baja adherencia (ULA; *Ultra Low Attachment*) de 96 pocillos y fondo redondo (Corning, Nueva York, NY, EE.UU.). Este sistema permite tener una única esfera en el centro del pocillo y una alta reproducibilidad en el tamaño (201).

Las condiciones de siembra fueron establecidas para cada línea de manera individual (entre 500 y 10<sup>4</sup> células por pocillo), de tal forma que, 4 días después de la siembra, la esfera tuviera un diámetro entre 300-500 µm, considerado el apropiado para iniciar los estudios, ya que la máxima distancia que el oxígeno puede difundir con facilidad desde los capilares es de 100 µm (191). De esta manera, se consigue establecer el núcleo de hipoxia y un gradiente de difusión de oxígeno y nutrientes presentes en los tumores. Los medios se cambiaron cada 3-4 días eliminando el 50% y sustituyéndolo por medio fresco. El tamaño de la esfera se calculó midiendo el diámetro los días 4, 7 y 14 tras la siembra. Para ello, se tomaron fotografías con un microscopio invertido Leica DMI6000 B acoplado a una cámara fotográfica Leica CTR6000, y se analizaron las imágenes con el programa Leica LAS AF (Leica, Wetzlar, Alemania).

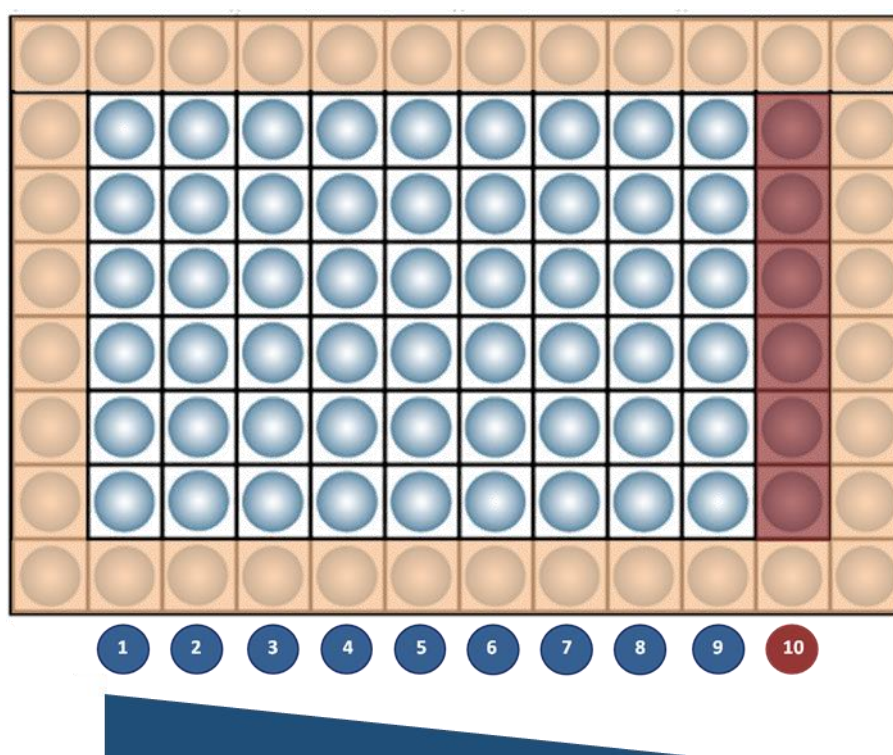
**Tabla 4.** Líneas de CO utilizadas. FBS: suero fetal bovino; P/S: penicilina/estreptomicina. Todos los componentes de los medios de cultivo son de Lonza (Basilea, Suiza).

Línea	Tipo de Tumor	Origen	Medio de Cultivo
<b>A2780</b>	Carcinoma de ovario	Tejido tumoral sin tratamiento previo.	RPMI 1640 + 2mM Glutamina + 1mM piruvato de sodio + 10% FBS + 1% P/S
<b>A2780CIS</b>	Carcinoma de ovario	Desarrollada <i>in vitro</i> . A2780 Resistente a CDDP.	RPMI 1640 + 2mM Glutamina + 1mM piruvato de sodio + 10% FBS + 1% P/S
<b>OVCAR3</b>	Adenocarcinoma	Ascitis. Paciente tratada con ciclofosfamida, adriamicina y CDDP.	RPMI 1640 + 2mM Glutamina + 1mM piruvato de sodio + 10% FBS + 1% P/S
<b>PEO1</b>	Adenocarcinoma seroso poco diferenciado	Ascitis peritoneal. Paciente previamente tratada con CDDP, 5-FU y clorambucil. Mutación en <i>BRCA2</i> .	DMEM + 2mM Glutamina + 10% FBS + 1% P/S
<b>PEO4</b>	Adenocarcinoma seroso poco diferenciado	Ascitis peritoneal. Paciente tratada con CDDP, 5-FU y clorambucil. Resistente a quimioterapia (misma paciente que PEO1).	DMEM + 2mM Glutamina + 10% FBS + 1% P/S
<b>PEO6</b>	Adenocarcinoma seroso poco diferenciado	Ascitis peritoneal. Paciente tratada con CDDP, 5-FU y clorambucil. Estado avanzado terminal (misma paciente que PEO1).	DMEM + 2mM Glutamina + 10% FBS + 1% P/S
<b>PEA1</b>	Adenocarcinoma poco diferenciado	Efusión de la cavidad pleural previo al tratamiento.	RPMI 1640 + 2mM Glutamina + 1mM piruvato de sodio + 10% FBS + 1% P/S
<b>PEA2</b>	Adenocarcinoma poco diferenciado	Ascitis peritoneal tras recaída después de tratamiento con CDDP y prednimustina (misma paciente que PEA1).	RPMI 1640 + 2mM Glutamina + 1mM piruvato de sodio + 10% FBS + 1% P/S
<b>PEO16</b>	Adenocarcinoma seroso poco diferenciado	Ascitis peritoneal. Recogida tras radioterapia.	RPMI 1640 + 2mM Glutamina + 1mM piruvato de sodio + 10% FBS + 1% P/S
<b>PEO14</b>	Adenocarcinoma seroso bien diferenciado	Ascitis peritoneal. Previo al tratamiento.	RPMI 1640 + 2mM Glutamina + 1mM piruvato de sodio + 10% FBS + 1% P/S
<b>TO14</b>	Adenocarcinoma seroso bien diferenciado	Metástasis en el omento obtenida en histerectomía (misma paciente que PEO14).	RPMI 1640 + 2mM Glutamina + 1mM piruvato de sodio + 10% FBS + 1% P/S
<b>PEO23</b>	Adenocarcinoma seroso bien diferenciado	Ascitis peritoneal. Recaída tras tratamiento con CDDP y clorambucil (misma paciente que PEO14).	RPMI 1640 + 2mM Glutamina + 1mM piruvato de sodio + 10% FBS + 1% P/S
<b>OV56</b>	Adenocarcinoma seroso poco diferenciado (estadio IV)	Acitis peritoneal. Paciente tratada con CDDP, ciclofosfamida, etopósido y tamoxifemo.	RPMI 1640 + 2mM Glutamina + 1mM piruvato de sodio + 10% FBS + 1% P/S
<b>OAW28</b>	Cistadenocarcinoma	Ascitis de una paciente que había sido tratada con CDDP y melfalan sin respuesta.	DMEM + 2mM Glutamina + 10% FBS + 1% P/S
<b>SKOV3</b>	Adenocarcinoma	Ascitis peritoneal.	DMEM + 2mM Glutamina + 10% FBS + 1% P/S
<b>59M</b>	Carcinoma de ovario (carcinoma de endometrio con áreas de células claras)	Ascitis recogida tras presentar la paciente metástasis en mama. No había sido tratada.	DMEM + 2mM Glutamina + 10% FBS + 1% P/S

### 3.3 Determinación del IC<sub>50</sub> y ensayos de proliferación celular.

El IC<sub>50</sub>, o dosis letal 50, es la concentración de fármaco que mata al 50% de la población celular. La determinación del IC<sub>50</sub> se calculó sembrando entre 3-6x10<sup>3</sup> células por pocillo, dependiendo de la línea celular, en una placa de 96 pocillos (*Multi Well 96*, MW96). A las 24 horas de la siembra se trataron las células con CDDP, cedido por la farmacia del Hospital Universitario La Paz, en diluciones seriadas 1:2, siendo la máxima concentración en la placa 100 µM, obteniendo 6 réplicas por cada concentración. A las 72 horas se fijaron las células con ácido tricloroacético al 10% y se tiñeron con una solución de SRB (Sigma-Aldrich) al 0,4% (p/v) en ácido acético al 1% (v/v). Una vez teñidas, se eluyeron en tampón Tris 10 mM y se midió la intensidad por colorimetría en el lector de placas Synergy 4 (BioTek, Winooski, VT, EE. UU.). Estos experimentos se realizaron por triplicado, y el valor de IC<sub>50</sub> se calculó por regresión lineal usando el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.), en base a la media de, al menos, tres experimentos.

El mismo procedimiento se realizó en los ensayos de proliferación, para ver las curvas de crecimiento de las distintas líneas celulares a las 24, 48 y 72 horas. El diseño básico de la placa de los experimentos se representa en la Figura 6.



**Figura 6.** Esquema de una MW96 para los experimentos de determinación del IC<sub>50</sub> y proliferación celular. Los extremos contienen PBS para evitar la evaporación. Cada columna contiene una concentración de fármaco diferente. La fila 10 es el control negativo.

### 3.3.1 Formación de colonias.

La proliferación celular de las líneas celulares se midió también mediante la capacidad de formar colonias al sembrarlas a baja densidad. Para ello, se determinó el número óptimo de células para cada línea, de tal manera que a los 10 - 15 días hubieran formado colonias de un tamaño visible sin microscopio. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (MW6) y el medio se sustituía dos veces por semana. Una vez alcanzado el tamaño óptimo de las colonias, se fijaron durante 20 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$  en metanol, se tiñeron con una solución al 0,5% de cristal violeta, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar.

El efecto del tratamiento con CDDP también se estudió con esta metodología. 24 horas tras la siembra, las células se trataron en diluciones seriadas 1:4, siendo la máxima concentración en la placa  $100\text{ }\mu\text{M}$ . El tratamiento se mantuvo durante 24 horas y se substituyó por medio fresco. Las células se dejaron crecer el mismo número de días que en los experimentos control y se fijaron como se menciona anteriormente.

### 3.4 Estudios de viabilidad celular en 3D y determinación del $\text{IC}_{50}$ .

Con el fin de analizar las diferencias ejercidas por el CDDP entre las células cultivadas en 2D y 3D, realizamos también estudios de viabilidad celular en esferas/agregados. Cuatro días después de la siembra de las células en placas ULA, las esferas/agregados fueron tratadas con CDDP, en diluciones seriadas 1:2, siendo la máxima concentración en placa  $200\text{ }\mu\text{M}$ , obteniendo 6 réplicas por cada concentración. A las 72 horas, las esferas se tiñeron con una solución que contenía: calceína AM (CalAM) (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.) para identificar a las células vivas, IP (Sigma-Aldrich) para identificar a las células muertas, y Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) para teñir todos los núcleos. La viabilidad de los esferoides se analizó en un citómetro de placas Celigo S (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA, EE.UU.). El valor del  $\text{IC}_{50}$  se calculó de la misma manera que para las células en 2D, pero en este caso se utilizó la media de intensidad de CalAM para la regresión lineal.

#### 3.4.1 Estudios de post esferas.

En las líneas celulares que no formaban esferas compactas, el cálculo del  $\text{IC}_{50}$  se realizó en dos pasos. Primero, se sembraron las células en 3D y se incubaron durante 4 días. Transcurrido este tiempo, las células se disgregaron y se sembraron en monocapa en una MW96 (post esferas). Al día siguiente, las células se trataron con diluciones seriadas 1:2 de CDDP a una concentración máxima de  $200\text{ }\mu\text{M}$ , durante 72 horas. El  $\text{IC}_{50}$  se calculó siguiendo el mismo protocolo utilizado con las células cultivadas en monocapa (tinción con SRB).

### 3.5 Estudios de ciclo celular.

En los estudios de ciclo celular, el procedimiento de siembra y tratamiento de las células fue el mismo utilizado para la determinación del IC<sub>50</sub>. A las 72 horas del tratamiento con CDDP, las células se fijaron con etanol frío al 80% durante 15 minutos a 4°C y, a continuación, se tiñeron con una solución de IP (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Tras un lavado con tampón fosfato salino (PBS; *Phosphate Buffered Saline*), las células se analizaron para ver el ciclo celular en un citómetro de placas Celígo S (Nexcelom Bioscience).

El análisis estadístico de los ensayos de ciclo celular se realizó mediante la prueba t de Student de comparación de medias utilizando el paquete estadístico SPSS versión 15.0 (IBM Corporation).

### 3.6 Estudios de migración e invasión.

#### 3.6.1 Migración e invasión en 2D.

Para los estudios de migración en 2D, se sembraron las células a alta confluencia ( $5 \times 10^4$  células por pocillo) sobre insertos adaptados para placas de 24 pocillos (MW24). En la parte inferior, la placa contenía medio con baja concentración de FBS (1%). Al alcanzar el 60% - 70% de confluencia, el medio de las células fue sustituido por medio con 1% de FBS, y se mantuvieron en él 24 horas. A continuación, se añadió sobre las células CalAM a una concentración de 1  $\mu$ M, y se incubaron durante una hora. Tras la incubación con CalAM, las células se lavaron con PBS y se añadió medio fresco al 1% de FBS en la parte superior, y el medio de la parte inferior fue sustituido por medio con 10% de FBS, que actuaba como quimioatrayente para las células. Los insertos, Corning® FluoroBlok™ (Corning), contienen una membrana permeable que permite la difusión del medio de cultivo entre la parte superior e inferior del inserto, y presentan poros de 8  $\mu$ m por los que las células pueden pasar del compartimento superior al inferior. Además, la membrana bloquea la transmisión de luz con una longitud de onda entre 400 y 700 nm, necesaria para excitar y visualizar la CalAM, cuyo pico de emisión es a 515 nm. Para los estudios de invasión, previamente se había añadido sobre el inserto una fina capa de *BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix* (Matrigel) (BD Biosciences) diluido al 33% en medio de cultivo al 1% de FBS.

Las células se observaron a las 6 y 24 horas tras la adición del quimioatrayente, y se tomaron fotografías con un microscopio invertido con lámpara de fluorescencia Leica DMI6000 B acoplado a una cámara fotográfica Leica CTR6000. Las imágenes se analizaron con el programa Leica LAS AF (Leica).

### 3.6.2 Migración e invasión en 3D.

En los estudios de migración e invasión en 3D se utilizaron esferas de día 4, cultivadas como se ha descrito anteriormente.

Para los estudios de migración, las esferas se transfirieron individualmente, utilizando una micropipeta, a un pocillo de una MW24 sobre el que previamente se había añadido una fina capa de Matrigel diluido al 50% en medio de cultivo. Una vez transferida la esfera se dejó reposar unos minutos y se tomaron fotografías a distintos tiempos para seguir de forma dinámica el proceso de migración de las células sobre el Matrigel.

En los ensayos de invasión, las esferas tienen que quedar incluidas en el Matrigel. Para conseguir la inclusión, las esferas se mantuvieron en la misma placa en la que habían sido sembradas, se retiró la mitad del medio de cultivo, y se añadió la misma cantidad de Matrigel, de tal manera que la esfera queda embebida en la matriz. Se tomaron fotografías a distintos tiempos para determinar si el esferoide tenía o no la capacidad de invadir la matriz.

En ambos casos se tomaron fotografías con un microscopio invertido Leica DMI6000 B acoplado a una cámara fotográfica Leica CTR6000, y se analizaron las imágenes con el programa Leica LAS AF (Leica).

## 3.7 Estudios de proteína.

### 3.7.1 Extracción y cuantificación de proteínas.

Las líneas celulares en cultivo fueron recogidas al alcanzar el 80%-90% de confluencia, lavadas 2 veces en PBS y lisadas con el tampón de lisis y extracción Pierce® RIPA (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Los lisados fueron incubados a 4°C durante 15 minutos y centrifugados a 14.000 r.c.f. durante 15 minutos.

Una vez lisadas, se procedió a la cuantificación de la cantidad de proteína mediante la técnica colorimétrica *DC Assay*. Para ello, se utilizó el kit *DC™ Protein Assay* (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones indicadas. Como curva patrón se utilizó el kit prediluido *Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Pre-Diluted Set* (ThermoFisher Scientific). La cuantificación colorimétrica se realizó en un lector de placas Synergy 4 (BioTek), y la concentración de proteína se calculó mediante regresión lineal sobre la recta patrón.

### 3.7.2 Western Blot.

De cada muestra, 20 µg de proteína fueron desnaturalizados y separados por electroforesis en un gel de poliacrilamida *AnykD™ Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels*. A continuación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (polifluoruro

de vinilideno) *Trans-Blot® Turbo™ Midi PVDF Transfer Packs* utilizando el sistema de transferencia *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System*. Todos los materiales utilizados pertenecen de la casa comercial Bio-Rad (Bio-Rad).

Las membranas se bloquearon a temperatura ambiente con leche desnatada al 5% en tampón tris salino con Tween 20 (TTBS; *Tween 20-Tris Buffered Saline*) y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente a 4°C durante la noche, y con el secundario al día siguiente. Las señales específicas se detectaron incubando las membranas con el sustrato quimioluminiscente *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* (ThermoFisher Scientific) y revelando en películas radiográficas. Tras la exposición, las membranas fueron tratadas con *Restore™ Western Blot Stripping Buffer* (ThermoFisher Scientific,) para eliminar los anticuerpos y poder ser re-incubadas con distintos anticuerpos.

La cuantificación se llevó a cabo por densitometría utilizando el programa Image J versión 1.45 (NIH, Bethesda, MD, EE.UU.). A continuación, se muestra una tabla con todos los anticuerpos utilizados para la técnica de *Western Blot* (WB).

**Tabla 5.** Anticuerpos utilizados en *Western Blot*.

Anticuerpo	Secundario	Dilución	Referencia	Casa comercial
BCAT	Ratón	1:1000	610154	BD Biosciences (San José, CA, EE. UU.)
EPAS1	Conejo	1:1000	E5408	Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EE. UU.)
GAPDH	Ratón	1:2500	sc-47724	Santa Cruz (Dallas, TX, EE. UU.)
HGF	Conejo	1:1000	Ab83760	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
SLC39A6	Conejo	1:1000	ab61307	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
SNAI3	Conejo	1:1000	orb13235	Biorbit (Cambridge, Reino Unido)
SPARC	Ratón	1:1000	NCL-O-NECTIN	LeicaBiosystems (Wetzlar, Alemania)
Secundario anti Ratón		1:5000	AP124P	Merck-Millipore (Billerica, MA, EE. UU.)
Secundario anti Conejo		1:5000	AP307P	Merck-Millipore (Billerica, MA, EE. UU.)

### 3.8 Estudios de ARN.

#### 3.8.1 Extracción del ARN.

Para extraer el ARN de las líneas celulares, primero se homogeneizaron y lisaron los *pellets* por microcentrifugación en columnas *QIAshredder*. La extracción del ARN se realizó mediante el kit comercial *RNeasy* siguiendo el protocolo indicado. Todos los productos utilizados son de Qiagen (Hilden, Alemania). La concentración y pureza del ARN total aislado se determinó mediante espectrofotometría con Nandodrop (Thermo Scientific), midiendo la absorbancia a las longitudes de onda 260 y 280 nm. El ARN obtenido se almacenó a -80°C hasta su utilización.

### 3.8.2 Síntesis del ADNc y análisis de la expresión génica.

La síntesis de ADNc y el análisis de la expresión génica se realizaron mediante RT-qPCR utilizando el kit en un solo paso *SYBR® Green Quantitative RT-qPCR Kit* (Sigma-Aldrich). Se analizó la expresión del gen *SLC39A6* con los cebadores directo GGAGATTAAGAAGCAGTTGTCCA y reverso TTCCTGTGGATGAGCATGAG, y como control endógeno se analizó la expresión el gen *GAPDH* con los cebadores directo CAATGGAAATCCCATCACCATC y reverso TGAAGACGCCAGTGGACTCC, todos ellos de Sigma-Aldrich. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Rotorgene (Qiagen).

## 4. INMUNOHISTOQUÍMICA.

### 4.1 Construcción de matrices tisulares (TMAs).

Para poder realizar los estudios de inmunohistoquímica (IHQ) de todos los casos de manera simultánea, se construyeron unas matrices de tejido (TMA; *Tissue Microarray*). Para ello, un patólogo especialista seleccionó dos zonas tumorales representativas en cada uno de los bloques de parafina (bloque donante). Mediante un *tissue arrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, EE.UU.) se procedió a la extracción de dos cilindros de tejido tumoral de 1 mm de diámetro, y se insertaron, de manera ordenada cada 0,8 mm, en un bloque de parafina vacío (bloque receptor). Los bloques resultantes, contienen un máximo de 50 biopsias, cada una por duplicado. De estos TMAs se obtuvieron secciones de 4 µm sobre las que se realizó la IHQ con anticuerpos específicos.

### 4.2 Inclusión de células en bloques de parafina.

Los *pellets* de líneas en cultivo se incluyeron en bloques de parafina para realizar la IHQ. Para ello, se recogieron las células y se fijaron en etanol al 70%. A continuación, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70%-100%), posteriormente se incubaron con xilol y, por último, se incluyeron en parafina. Se analizó por tinción con hematoxilina/eosina de cortes seriados la localización del mayor número posible de esferas del tamaño óptimo, y una vez identificadas, se obtuvieron secciones de 3,5 µm para su uso en IHQ.

Las esferas provenientes de cultivos en 3D se recogieron una a una usando una micropipeta, y se fijaron en paraformaldehído al 4%. Tras la fijación, las esferas fueron embebidas en bloques de agar noble al 4% e incluidas en parafina siguiendo el mismo procedimiento usado con los *pellets*.



### 4.3 IHQ en líneas celulares y tejidos parafinados.

Los cortes se desparafinaron en xilol y se rehidrataron en una batería de concentraciones decrecientes de etanol (100%-70%) y finalmente agua. A continuación, se llevó a cabo un proceso de desenmascaramiento del antígeno utilizando el sistema PT Link (Dako, Glostrup, Dinamarca). Tras el desenmascaramiento se inactivó la peroxidasa endógena durante 10 minutos, y se incubaron con los anticuerpos primario y secundario (ver Tabla 6 con las indicaciones para cada anticuerpo). Por último, se revelaron mediante la aplicación del cromógeno diaminobencidina (DAB). Para poder ver los núcleos celulares se realizó una contratinción con hematoxilina. Todos los compuestos usados para la IHQ son del kit *Dako REAL™ Detection System* (Dako). Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio Olympus BX51 acoplado a una cámara fotográfica Olympus DP70 (Olympus, Shinjuku, Tokio, Japón).

En tejido tumoral, la valoración de los marcadores se realizó por patólogos especialistas, atendiendo a la localización celular de la tinción (Tabla 6). Los marcadores se valoraron de la siguiente manera: en ECAD, NCAD y BCAT sólo se tuvo en cuenta la expresión de membrana, y se valoró como positiva cuando la tinción estaba conservada (C), o negativa cuando estaba reducida (R) o ausente (A); Snail, Slug, Zeb1, Zeb2, HGF, HIF-2 $\alpha$ SLC39A6 y SPARC se valoraron como positivo o negativo; VHL y MET se valoraron como negativo, focal o difuso (más del 10% de células positivas); la tinción nuclear de SNAI3, siempre positiva, se estratificó en débil o fuerte; ID4 se valoró según la intensidad de la tinción (0 – 2). La presencia de los factores ZEB y SPARC se valoró tanto en el tumor como en el estroma. Las líneas celulares se valoraron de la misma manera. Las proteínas CDH11 y PIK3R1 no se pudieron valorar dado que los anticuerpos no funcionaron correctamente.

Se realizó una clasificación fenotípica de las pacientes y de las líneas celulares atendiendo a la expresión de los marcadores epiteliales ECAD y PANCK y los marcadores mesenquimales NCAD y VIM. En el caso de las pacientes únicamente se valoraron las cadherinas ya que la expresión de PANCK era difusa en todos los casos y no permitía la estratificación. Se consideraron de fenotipo epitelial las pacientes que sólo expresaban ECAD, de fenotipo mesenquimal las que sólo expresaban NCAD, y de fenotipo intermedio aquellos casos en los que existía una co-expresión de ambos marcadores. En cuanto a las líneas celulares, se consideraron líneas de fenotipo epitelial aquellas que sólo expresan marcadores epiteliales y líneas mesenquimales las que únicamente expresan marcadores mesenquimales. En el caso de co-expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales, se tuvo en cuenta cuántos se expresaban de cada tipo para determinar si el fenotipo era epitelial o mesenquimal

intermedio. En esta clasificación de las líneas, para los cuatro marcadores se consideró tinción positiva tanto la conservada como la reducida.

Se realizaron distintas pruebas estadísticas para correlacionar la expresión de proteínas mediante IHQ y las variables clínicas analizadas utilizando los programas R Statistics 3.2 y SPSS 15.0 (IBM Corporation).

**Tabla 6.** Anticuerpos utilizados en la IHQ y localización en tejido tumoral y líneas celulares. Casas comerciales: 1. Abcam (Cambridge, Reino Unido), 2. CalBioagents (San Mateo, CA, EE. UU.), 3. Dako (Glostrup, Dinamarca), 4. LeicaBiosystems (Wetzlar, Alemania), 5. Merck-Millipore (Billerica, MA, EE. UU.), 6. Roche (Basilea, Suiza), 7. Santa Cruz (Dallas, TX, EE. UU.), 8. Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EE. UU.). C = citoplasma; M = membrana; N = núcleo; N. V. = no valorado.

Anticuerpo	Secundario	Dilución	Referencia	Casa comercial	Localización en tejido	Localización en células
Cadherina E	Ratón	Prediluido	IR059	3	M	M
Cadherina N	Conejo	1:250	ab1221	1	M, N	M, N
Snail	Conejo	1:100	ab135708	1	C, N	C
Slug	Conejo	1:200	ab38551	1	C, M	C
Pancitoqueratina	Ratón	Prediluido	IR053	3	N. V.	M
Zeb1 (AREB6)	Ratón	1:200	ab180905	1	N	N
Zeb2 (SIP-1)	Conejo	1:250	sc-48789	7	C, N	N
Vimentina	Ratón	Prediluido	IR630	3	N. V.	M
$\beta$ -Catenina	Ratón	Prediluido	IR702	3	C, M	C, M
C-Met	Conejo	Prediluido	790-4430	6	M	N. V.
HGF	Conejo	1:700	ab83760	1	C	C
HIF-2 $\alpha$	Conejo	1:500	ES408	8	C, N	N
ID4	Conejo	1:200	M106	2	N	N. V.
SLC39A6	Conejo	1:100	ab61307	1	C	C
SNAI3	Conejo	1:500	HPA016757	8	N	N
SPARC	Ratón	1:100	NCL-O-NECTIN	4	C	C
VHL	Conejo	1:100	ab135576	1	M	N. V.
Dako REAL™ EnVision™ HRP Conejo:Ratón		Prediluido	K5007	3		
Secundario anti Ratón		1:1000	AP124P	5		
Secundario anti Conejo		1:1000	AP307P	5		

#### IV. RESULTADOS

## 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LAS PACIENTES.

Las características clínico-patológicas de las pacientes incluidas en este estudio se describen en la Tabla 7. La media de edad al diagnóstico fue de 57 años, siendo la mayoría de los tumores (65,5%) de histología serosa de alto grado (HGSOC). El 34,5% de los tumores restantes incluidos en la serie comprende: 7 LGSOC (24,1%), 5 CCC (17,2%), 4 MC (13,8%), 3 EC (10,3%), 2 carcinomas mixtos (6,9%), 5 carcinomas indiferenciados (17,2%), 2 carcinosarcomas (6,9%) y 1 carcinoma transicional (3,4%).

Se disponía de datos sobre la cirugía en el 57% de las pacientes, de las cuales, cerca del 42% tuvieron una citorreducción óptima ( $ER \leq 1$  cm). Todas las pacientes recibieron al menos 6 ciclos de tratamiento quimioterápico basado en la combinación carboplatino/paclitaxel, y el 62,7% respondieron al mismo, según los criterios RECIST aplicados.

**Tabla 7.** Variables clínico-patológicas analizadas.

Variable		Media (rango)	
Edad (años)		57 (21 – 85)	
SLP (meses)		27,2 (0,7 – 127,5)	
SG(meses)		38,9 (0,8 – 127,5)	
Variable		Casos	Porcentaje (%)
Cirugía	Óptima	20	41,7
	Subóptima	28	58,3
Histología	HGSOC	55	65,5
	Otros	29	34,5
Estadio	III	70	83,3
	IV	14	16,7
Grado de diferenciación	Bajo	9	10,8
	Alto	74	89,2
Ascitis	Sí	44	72,1
	No	17	27,9
Respuesta al tratamiento	Sí	52	62,7
	No	31	37,3
Recaída	Sí	67	82,7
	No	14	17,3
Exitus	Sí	53	67,1
	No	26	32,9

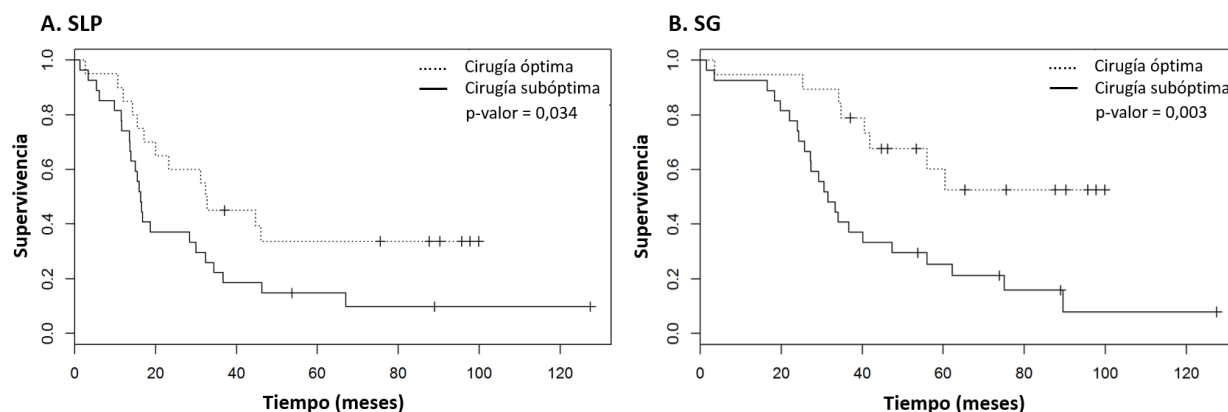
Durante el periodo de seguimiento las pacientes fueron revisadas cada 3 meses durante los 2 primeros años, cada 6 meses del segundo al quinto año, y posteriormente una vez al año. En el global de enfermas, el 82,7% de las pacientes tuvo, al menos, una recaída, y el 67,1% falleció a casusa de la enfermedad. La media de SLP fue de 27,2 meses y la media de SG de 38,9 meses.

## 2. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES CLÍNICAS.

Se analizó el efecto de las variables clínicas (edad, histología, cirugía óptima, presencia de ascitis al diagnóstico, estadio de la enfermedad y grado de diferenciación) sobre la supervivencia de las pacientes, mediante un análisis univariante, recogido en la Tabla 8. La única variable que mostró asociación significativa con SLP y SG fue la cirugía óptima (Figura 7). En el grupo de pacientes con resección subóptima, la mediana de SLP fue de 16,3 meses y la de SG fue de 31,6 meses, mientras que en el grupo de pacientes con citorreducción óptima, la mediana de SLP fue de 32,6 meses, y no se alcanzó en la SG.

**Tabla 8.** Análisis univariante para SLP y SG con respecto a las variables clínicas.

Variable	SLP				SG			
	HR	95% L. I.	95% L. S.	p-valor	HR	95% L. I.	95% L. S.	p-valor
Edad	1,004	0,982	1,026	0,712	1,014	0,989	1,04	0,268
HGSOC	1,091	0,645	1,845	0,747	0,658	0,372	1,166	0,152
Cirugía óptima	0,489	0,248	0,966	<b>0,039</b>	0,312	0,139	0,701	<b>0,005</b>
Ascitis	1,121	0,59	2,129	0,727	1,254	0,621	2,532	0,527
Estadio	1,236	0,743	2,054	0,415	0,825	0,471	1,447	0,503
Grado dif.	1,187	0,62	2,273	0,604	1,1	0,518	2,337	0,804



**Figura 7.** Curvas KM de SLP (A) y SG (B) según la cirugía óptima.

## 3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE VARIABLES GÉNICAS.

En el estudio de expresión de genes relacionados con TEM se incluyeron 43 genes. Se utilizó, además, la expresión de 5 genes HK seleccionados en un estudio previo para la normalización, y dichos genes fueron excluidos como variables en estudio. Además, se analizaron las 11 variables clínico-patológicas mencionadas anteriormente (Tabla 7). El análisis

descriptivo de los valores de expresión de los genes incluidos en el estudio se muestra en la Tabla 2 del Anexo.

Al tener un tamaño muestral reducido y un número elevado de variables, lo primero que se hizo fue analizar la correlación existente entre cada una de las variables génicas incluidas en el estudio. Como se puede ver en la Figura 1 del documento Anexo, existe correlación (valor superior a 0,25 positivo o negativo) entre la mayoría de los genes, lo que podría impedirnos obtener el mejor predictor utilizando métodos estadísticos clásicos. Encontramos también tres asociaciones génicas indicativas de alta correlación (valor superior a 0,75), que se dan entre los genes *CXCL12* y *ZEB2*, *CXCL12* y *SPARC* y *CDH11* y *SPARC*.

Para explorar el impacto de las distintas variables génicas sobre el subtipo histológico del tumor, se realizaron dos tipos de análisis, un univariante clásico mediante regresión de Cox y una corrección mediante el test FDR. El análisis univariante de los valores de expresión de los 43 genes incluidos en este estudio en relación a la histología de los tumores (seroso de alto grado vs. Otros subtipos histológicos) demostró diferencias estadísticamente significativas ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) en 7 de los genes (*CDH1*, *CDH2*, *CDH3*, *EPAS1*, *IL6R*, *ITGB3* y *PIK3CA*); no obstante, ninguno de ellos se confirmó mediante el test FDR. Los resultados se muestran en la Tabla 3 del documento Anexo. Dado este resultado, se incluyeron todas las pacientes, con distintos subtipos histológicos de CO, para generar los modelos de supervivencia.

Se analizó también el efecto de las variables génicas sobre la supervivencia, empleando de nuevo un análisis univariante clásico (Tablas 4 y 5 del Anexo). Para la SLP mostraron significación estadística ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) los genes *CTNNB1* (HR = 0,66; I.C. 95% 0,49 – 0,87) y *SLC39A6* (HR = 1,37; I.C. 95% 1,0 – 1,87), y para la SG únicamente el gen *CTNNB1* (HR = 0,72; I.C. 95% 0,53 – 0,98). Por tanto, *SLC39A6* es considerado un factor de riesgo para la SLP y *CTNNB1* un factor protector en ambos casos. Como veremos más adelante, los datos de *SLC39A6* se valoraron *in silico*, donde se mantiene una asociación significativa con la SLP (Figura 9).

#### 4. GENERACIÓN DE MODELOS DE SUPERVIVENCIA.

Para la generación de los modelos de supervivencia, tanto de SLP como de SG, se aplicaron los métodos de Boosting y regresión penalizada de Lasso. Mediante el método de Boosting se detectaron 25 variables para SLP y 23 para SG, mientras que el método Lasso detectó 11 variables génicas para SLP y 6 para SG. Todos estos datos se muestran en las Tablas 4 y 5 del Anexo. Posteriormente, se unificaron los datos obtenidos por ambos métodos de análisis para intentar encontrar coincidencias. Los modelos seleccionados contenían datos de

expresión de 10 genes para SLP (*CDH11*, *CTNNB1*, *EPAS1*, *HGF*, *ID4*, *PIK3R1*, *SLC39A6*, *SNAI3*, *SPARC* y *VHL*) y 6 para SG (*CTNNB1*, *EPAS1*, *HGF*, *MET*, *SNAI3* y *SPARC*) (Tabla 9). Tanto *CTNNB1* como *SLC39A6* mantienen la significación estadística y el signo del HR mostrados en el análisis univariante.

**Tabla 9.** Modelos combinados de supervivencia (SLP y SG).

SLP					SG				
Gen	HR	95% L. I.	95% L. S.	p-valor	Gen	HR	95% L. I.	95% L. S.	p-valor
<i>CDH11</i>	0,713	0,504	1,008	0,056	<i>CTNNB1</i>	0,702	0,509	0,969	<b>0,031</b>
<i>CTNNB1</i>	0,635	0,451	0,894	<b>0,009</b>	<i>EPAS1</i>	0,609	0,417	0,891	<b>0,011</b>
<i>EPAS1</i>	0,733	0,517	1,041	0,082	<i>HGF</i>	1,249	1,056	1,478	<b>0,009</b>
<i>HGF</i>	1,208	1,012	1,443	<b>0,037</b>	<i>MET</i>	1,140	1,004	1,295	<b>0,043</b>
<i>ID4</i>	1,004	0,829	1,215	0,968	<i>SNAI3</i>	1,074	0,877	1,316	0,490
<i>PIK3R1</i>	1,038	0,791	1,362	0,788	<i>SPARC</i>	0,848	0,667	1,079	0,179
<i>SLC39A6</i>	2,237	1,342	3,730	<b>0,002</b>					
<i>SNAI3</i>	1,209	0,972	1,504	0,088					
<i>SPARC</i>	0,988	0,701	1,393	0,944					
<i>VHL</i>	0,931	0,779	1,111	0,425					
<b>SLP</b>	<b>p-valor</b>	<b>0,0002</b>			<b>SG</b>	<b>p-valor</b>	<b>0,004</b>		

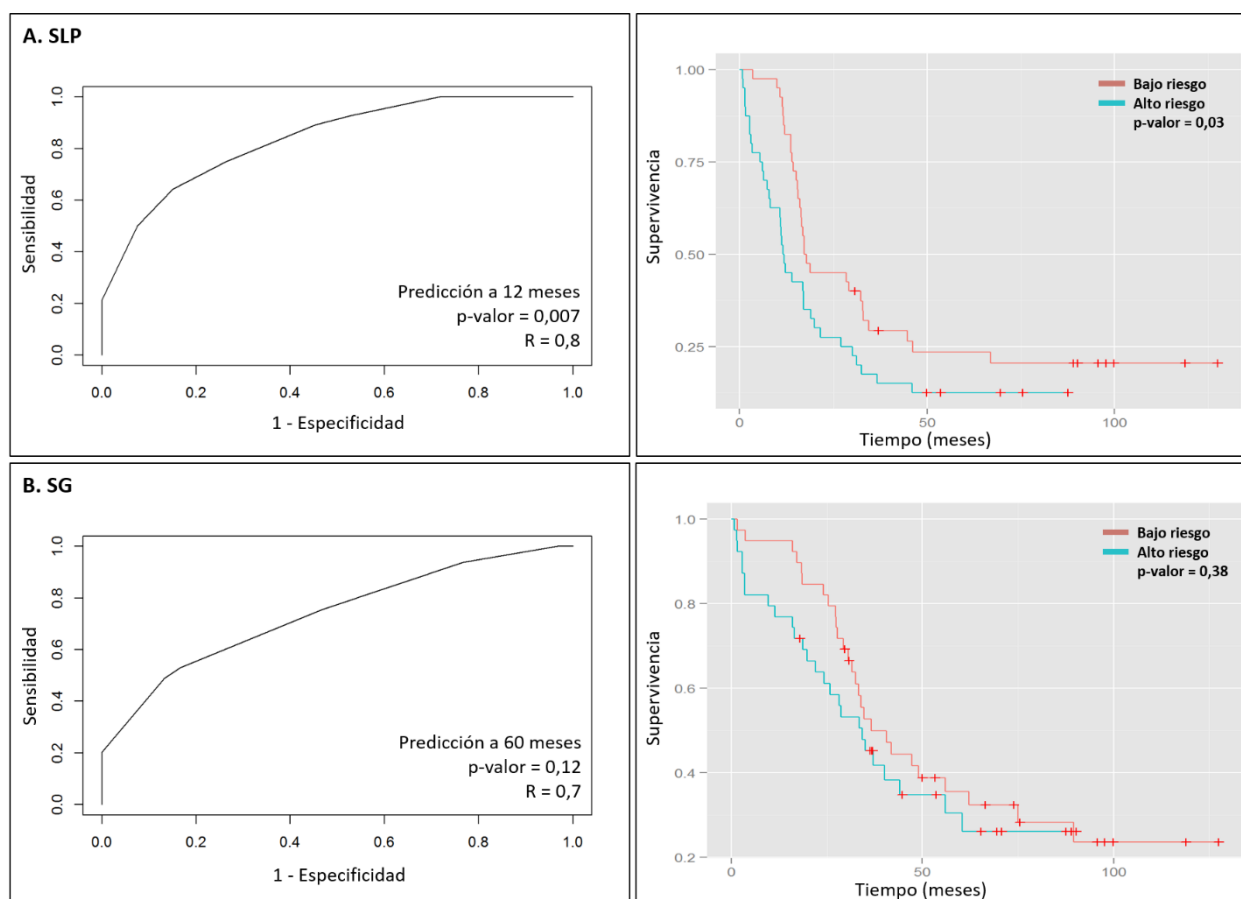
Ambos modelos eran capaces de discriminar dos grupos de pacientes de forma significativa en cuanto a la SLP y la SG (p-valor < 0,005). Por este motivo, decidimos analizar la precisión de los modelos a tiempos concretos, mediante curvas ROC (Figura 8). En el caso de la SLP, la predicción es buena y se mantiene constante a lo largo del tiempo, con valores de AUC (área bajo la curva) en torno a 0,8. En el caso de la SG, la mejor predicción resultó a tiempos cortos (12 meses) con un valor R = 0,8, perdiendo potencia predictiva a los 60 meses. Los valores R y el p-valor de las curvas ROC se recogen en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Valores R de las curvas ROC a distintos tiempos y p-valor asociado para los modelos de supervivencia.

SLP			SG		
Tiempo (meses)	R (AUC)	p-valor	Tiempo (meses)	R (AUC)	p-valor
6	0,82	0,09	6	0,77	0,21
12	0,8	<b>0,007</b>	12	0,8	<b>0,04</b>
24	0,72	0,21	24	0,73	<b>0,04</b>
36	0,86	<b>0,006</b>	36	0,74	<b>0,01</b>
48	0,81	0,08	48	0,71	0,05
60	0,81	0,08	60	0,7	0,12

Se construyeron también las curvas KM para ambos modelos (Figura 8). El p-valor obtenido es significativo únicamente para el modelo de SLP (p-valor = 0,03), y, por tanto, este

modelo serviría para separar a las pacientes en grupos de alto y bajo riesgo. En el caso de la SG, el p-valor no alcanza niveles significativos, probablemente porque las curvas se cruzan a tiempos largos, cuando el modelo no tiene buena capacidad predictiva. Por tanto, este modelo no serviría para separar a las pacientes en grupos de alto y bajo riesgo.

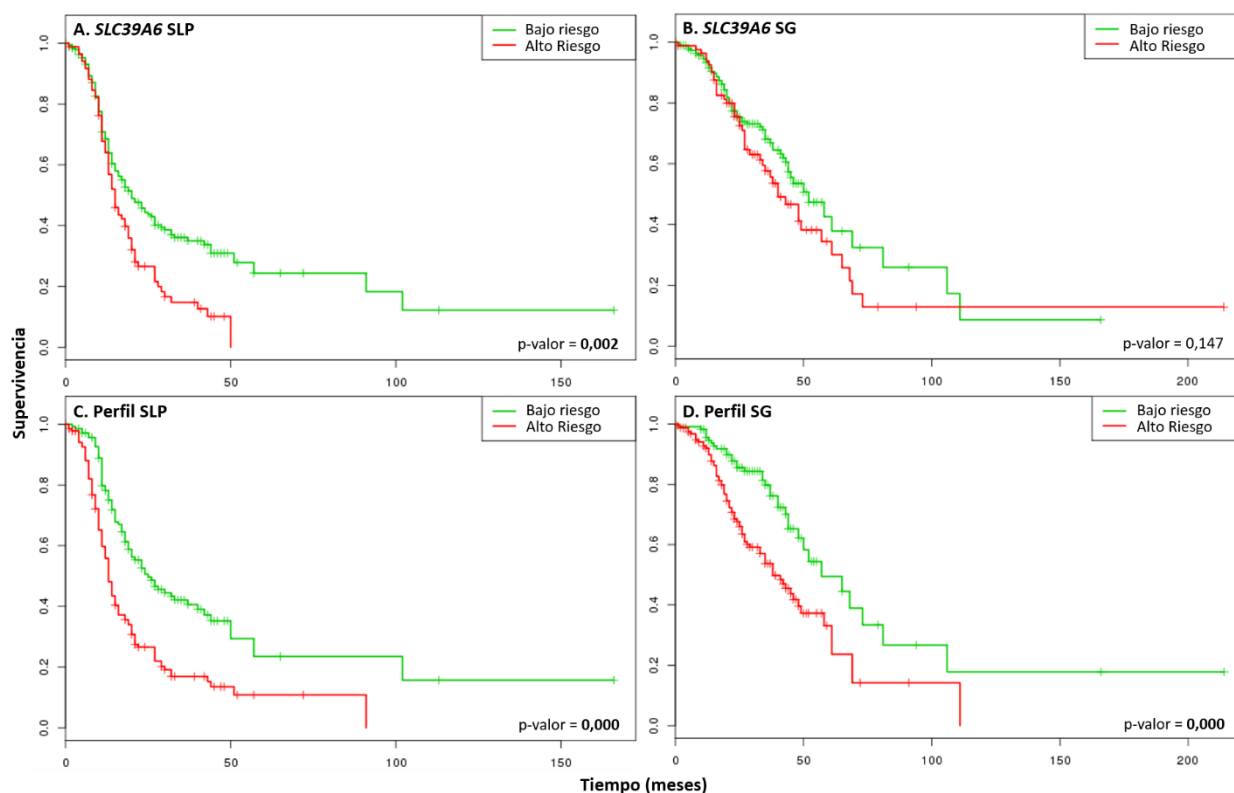


**Figura 8.** A. Curvas ROC (izquierda) y KM (derecha) de predicción para los modelos de SLP (A) y SG (B).

#### 4.1 Validación *in silico* de los perfiles de supervivencia.

La validación *in silico* de la asociación del gen *SLC39A6* con la SLP y de los perfiles de supervivencia se realizó con la plataforma *online* SurvExpress (250). Se utilizó la serie de pacientes de Tothill y colaboradores, compuesta por una cohorte de 285 pacientes con CO, carcinoma primario peritoneal o carcinoma de trompas de Falopio (36). Como se muestra en las curvas KM de la Figura 9, tanto la expresión de *SLC39A6* como ambos modelos fueron validados. Al igual que en el análisis univariante, el gen *SLC39A6* sólo mostró una asociación estadísticamente significativa con la SLP, con un  $p\text{-valor} = 0,002$ , y se mantiene como factor de riesgo con un  $HR = 1,62$  (I.C. 95% = 1,20 – 2,19). En el caso de los perfiles, para la SLP el p-valor del modelo es inferior a 0,001, con un  $HR = 2,08$  (I.C. 95% = 1,55 – 2,79), mientras que en la SG se obtiene un p-valor inferior a 0,001 y un  $HR = 2,13$  (I.C. 95% = 1,42 – 3,18).





**Figura 9.** Curvas KM de la validación *in silico* de los modelos del gen *SLC39A6*. A, SLP y B, SG y de los perfiles de SLP (C) y SG (D).

## 5. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL DE UN PANEL DE LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA DE OVARIO.

### 5.1 Descripción de las líneas celulares. Cultivo en 2D.

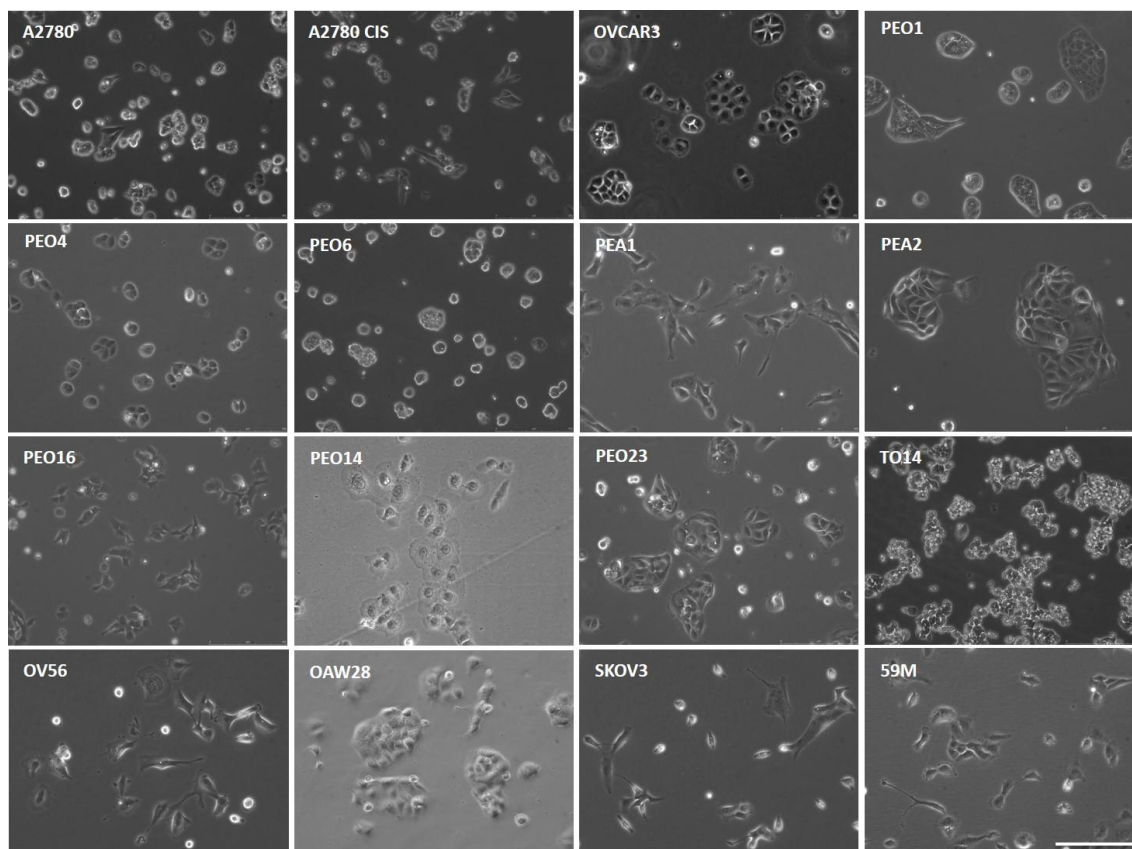
En este trabajo hemos utilizado un panel de 16 líneas celulares de CO. Representando la heterogeneidad de subtipos histológicos encontrada en las pacientes, dicho panel se compone de 10 líneas derivadas de pacientes con HGSO, 4 líneas de subtipo EC/CCC, una línea de origen mixto, y una línea, PEO16, cuyo origen está aún en debate, aunque se acepta que podría ser de origen seroso, pero sin tener tan claro si se corresponde con un alto o bajo grado. Las líneas PEA/PEO fueron descritas por Langdon y colaboradores en 1988. Son líneas pareadas, provenientes de 4 pacientes distintas, establecidas en diferentes momentos de la enfermedad, y por tanto, antes o después de haber recibido diferentes tratamientos, como podemos ver en la Tabla 4 (251). Hemos empleado una de las últimas clasificaciones histológicas publicadas, establecida por Beaufort y colaboradores, atendiendo a la morfología y a las mutaciones que presentaban las distintas líneas (252). Además, estas líneas, muestran un amplio rango de sensibilidad al tratamiento con CDDP, como veremos más adelante.

En cuanto al origen de las líneas, la mayoría fueron obtenidas a partir de líquido ascítico. Las excepciones son la línea PEA1, proveniente de una efusión pleural, y otras dos líneas obtenidas a partir de tumor, A2780 a partir de un tumor primario y TO14, obtenida a partir de una metástasis en el omento (251, 252). La línea A780CIS fue desarrollada *in vitro* a partir de las A2780 mediante exposición continuada a CDDP, para hacerla resistente a este fármaco. Estas características también se describen en la Tabla 11, junto con la morfología celular y el tiempo de duplicación a las 24 horas.

**Tabla 11.** Principales características de las líneas celulares. T.D. 24h = Tiempo de duplicación calculado a las 24 h; U.F.C. = Unidades formadoras de colonia (nº de células sembradas en los experimentos de colonias); MX = Subtipo histológico mixto.

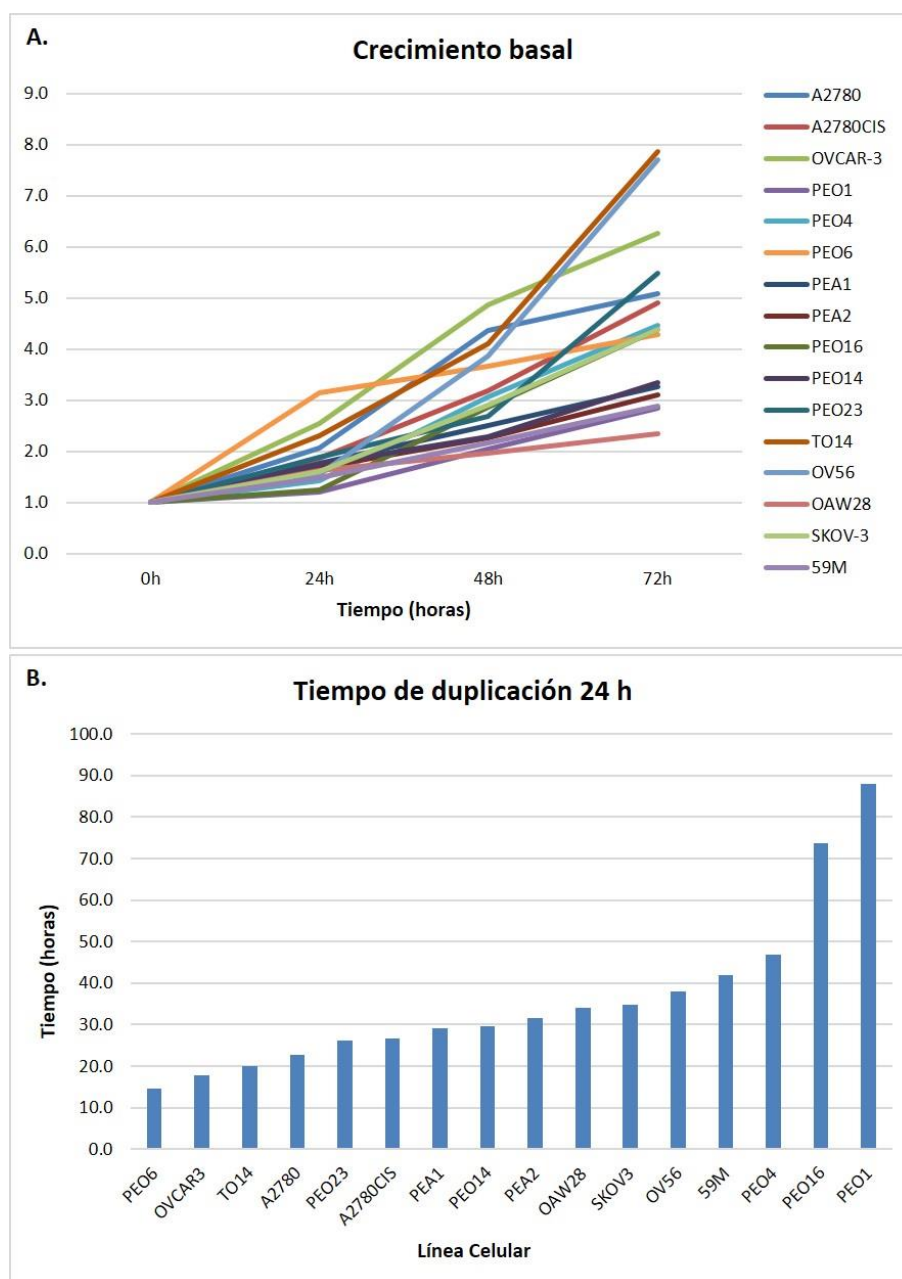
Línea	Histología	Origen	Morfología	T.D. 24 h	U.F.C.
A2780	EC/CCC	Tumor	Redonda	22,82	100
A2780CIS	EC/CCC	Tumor	Redonda	26,59	100
OVCAR3	HGSOC	Ascitis	Redonda	17,83	100
PEO1	HGSOC	Ascitis	Mixta	87,96	1000
PEO4	HGSOC	Ascitis	Redonda	46,73	1000
PEO6	HGSOC	Ascitis	Redonda	14,49	1000
PEA1	HGSOC	Efusión pleural	Fusiforme	29,16	200
PEA2	HGSOC	Ascitis	Mixta	31,49	200
PEO16	LGSOC/HGSOC	Ascitis	Fusiforme	73,81	500
PEO14	HGSOC	Ascitis	Redonda	29,59	500
PEO23	HGSOC	Ascitis	Mixta	26,17	100
TO14	HGSOC	Metástasis	Redonda	19,97	100
OV56	EC/CCC	Ascitis	Fusiforme	38,05	200
OAW28	HGSOC	Ascitis	Redonda	34,15	500
SKOV3	EC/CCC	Ascitis	Fusiforme	34,78	500
59M	MX	Ascitis	Fusiforme	41,91	5000

En la Figura 10 se pueden ver fotografías en contraste de fase de las líneas celulares utilizadas. Todas las líneas provenientes de un HGSOC presentan una morfología redondeada/epitelial, con la excepción de las PEA1, que son más fusiformes. No obstante, Las líneas PEO1, PEA2 y PEO23, tienen una morfología mixta, en las que encontramos también células de tipo fusiforme. Por el contrario, las líneas provenientes de tumores de los otros subtipos histológicos, presentan de forma constante una morfología fusiforme, salvo las A2780 y su línea derivada A2780CIS. Esta última se diferencia hacia una morfología fusiforme si se mantiene en cultivo durante más de 15 pases.



**Figura 10.** Fotografías de las distintas líneas celulares de CO utilizadas en el estudio (contraste de fases, 10X, barra de escala 250  $\mu$ m).

Todas las líneas crecen de manera adherente, pegándose al plástico de cultivo pocas horas después de la siembra. Como se puede ver en la Figura 11A, las líneas con un mayor crecimiento basal a las 72 horas son TO14, OV56 y OVCAR3, y las de crecimiento más lento OAW28, PEO1 y 59M. En cuanto el tiempo de duplicación, las más rápidas fueron las PEO6 (14,5 horas) y las más lentas las PEO1 (88 horas), como se muestra en la Figura 11B. Este tiempo fue medido a las 24 horas, cuando todas las líneas se encontraban en fase exponencial de crecimiento basal. No encontramos ninguna asociación entre la velocidad de crecimiento y el origen o la morfología de las células.



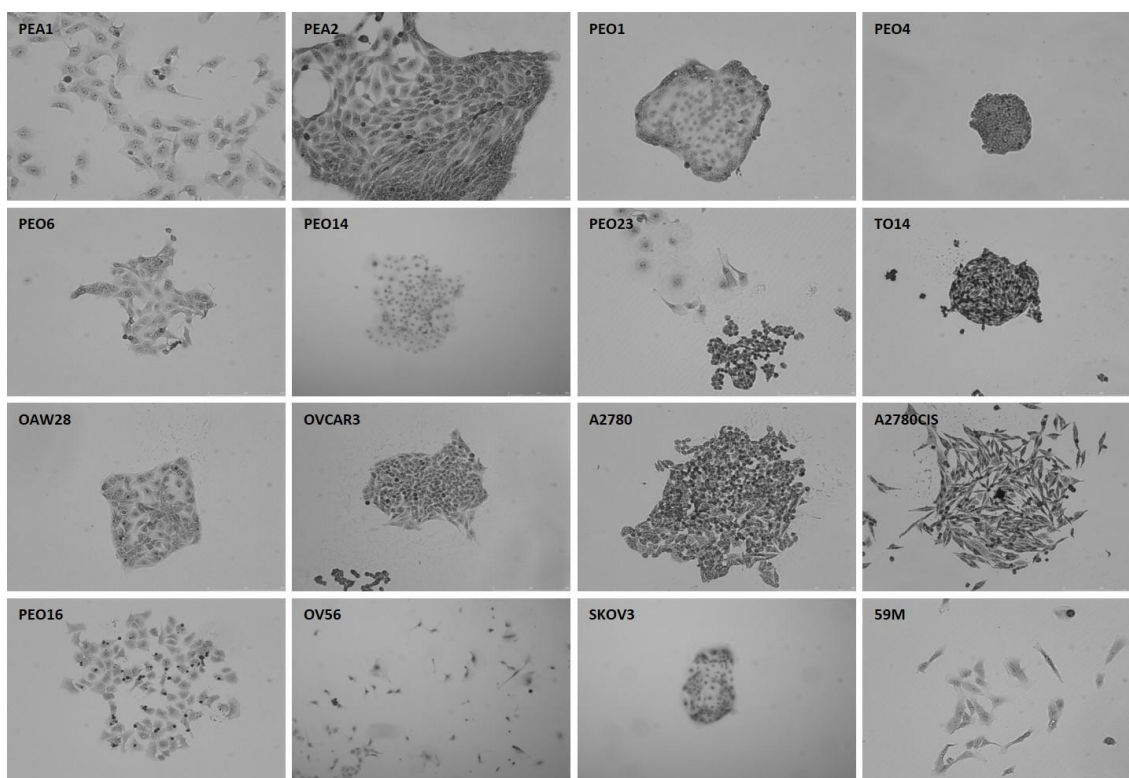
**Figura 11.** Características de crecimiento de las líneas celulares de CO. A. Crecimiento basal de las células cultivadas en monocapa, medido a las 24, 48 y 72 horas. B. Tiempo de duplicación de las líneas medido a las 24 horas.

#### 5.1.1 Formación de colonias.

La proliferación celular se midió también estudiando la capacidad de formar colonias de las líneas celulares sembradas a baja densidad en una MW6. El número de células sembrado en cada línea se muestra en la Tabla 11. Como se puede ver en la Figura 12, la morfología de las colonias no varía con respecto a la morfología observada al cultivarlas a una densidad normal, salvo las SKOV3, que crecen de manera mucho más compacta. Cabe destacar que la línea 59M no tiene capacidad de formar colonias y necesita ser sembrada a alta

densidad para mantenerse en cultivo. Por contra, las líneas PEA1 y OV56 formaban rápidamente un césped sobre el pocillo al sembrarlas a baja densidad.

Las líneas que mostraron mayor velocidad de crecimiento y mayor capacidad de formar colonias fueron A2780, A2780CIS, OVCAR3, PEO23 y TO14. En estas líneas era suficiente sembrar 100 células por pocillo. En el lado opuesto encontramos el trío formado por las líneas PEO1/PEO4/PEO6, que necesitaban una mayor confluencia, 2000 células por pocillo, para poder formar colonias.



**Figura 12.** Colonias individuales de cada una de las líneas celulares (contraste de fases, 10X, barra de escala 250  $\mu\text{m}$ ).

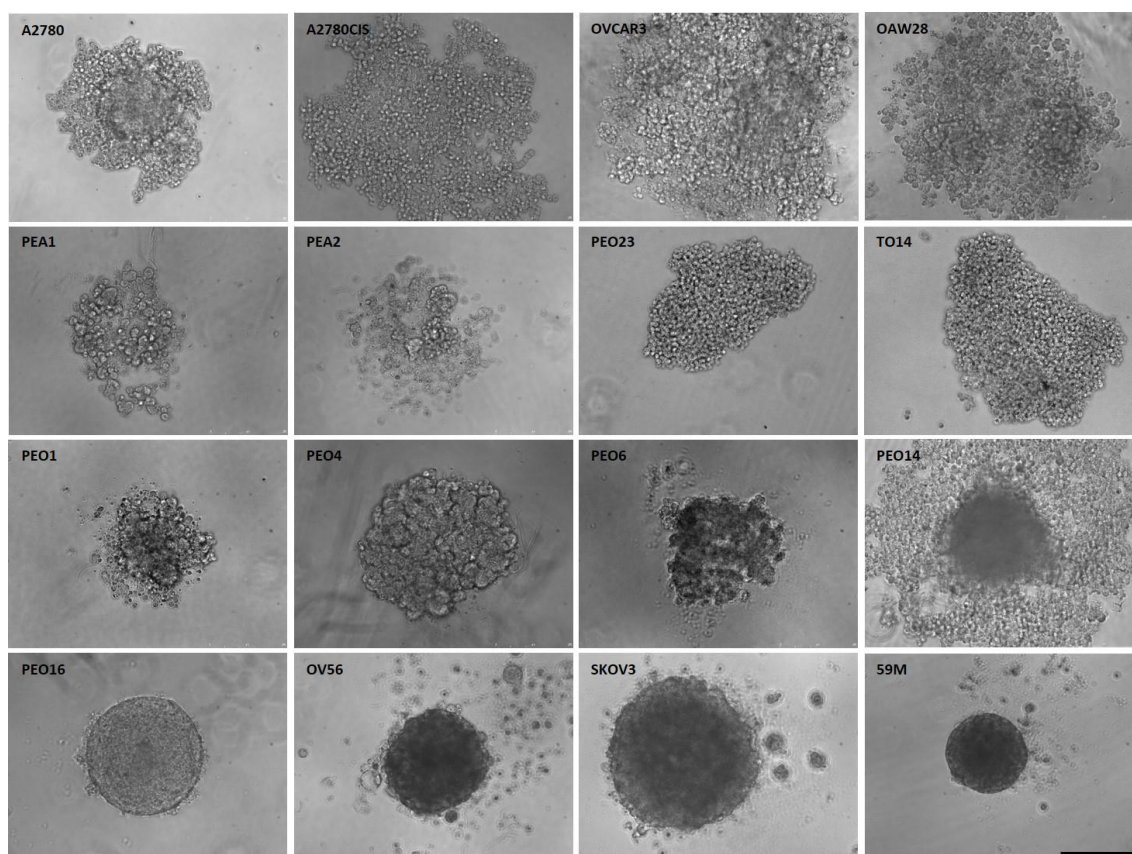
## 5.2 Formación de esferas. Cultivo en 3D.

En los ensayos de cultivo en 3D se emplearon placas de cultivo con baja adhesión y se establecieron las condiciones de cultivo para cada una de las líneas celulares. Se sembraron con distinto número de células (Tabla 12), de tal manera que, a día 4, tuvieran un diámetro entre 300 y 400  $\mu\text{m}$ , suficiente para generar un núcleo hipóxico en el interior.

Las células se comportan de distinta manera al cultivarlas en 3D y forman distintos tipos de agregados celulares. Por tanto, se han dividido las líneas celulares en tres grupos según el tipo de agregado que forman al cultivarlas en 3D. El primer grupo está formado por las líneas A2780, A2780CIS, OVCAR3, OAW28, PEA1, PEA2, PEO23 y TO14, que al cultivarse en 3D forman agregados laxos en los que se distinguen células separadas. El segundo grupo forma



agregados compactos, en los que no se puede distinguir bien el contorno de las células, pero sí el del agregado celular, y está formado por las líneas PEO1, PEO4, PEO6 y PEO14. Únicamente las líneas PEO16, OV56, SKOV3 y 59M son capaces de formar esferas compactas con bordes definidos en las que no se distinguen las uniones intercelulares; estas líneas componen el tercer grupo (Figura 13). Ninguna de las líneas de subtipo seroso de alto grado o de morfología epitelial tiene la capacidad de formar esferas compactas. Sin embargo, todas las líneas de morfología fusiforme, salvo las PEA1 forman esferas compactas al cultivarlas en 3D.



**Figura 13.** Líneas celulares cultivadas en 3D durante 4 días. El número de células varía dependiendo de la línea (contraste de fases, 10X, barra de escala 250  $\mu\text{m}$ ).

Morfológicamente, las estructuras observadas en esferas presentan células cuboidales, y en algunos casos incluso se han podido observar estructuras papilares similares a las que presentan los tumores, hecho que no hemos observado en el cultivo en dos dimensiones (Figura 10).

El número de células de inicio y el tamaño del esferoide son parámetros cruciales para estos experimentos. Por todo ello, se realizó un amplio número de pruebas para determinar el número óptimo de células sembradas para cada una de las líneas estudiadas, y que proporcionaran, en el caso de las células que forman esferoides, una esfera de diámetro no superior a 400  $\mu\text{m}$  en el día 4 de crecimiento. Otro factor importante a tener en cuenta es el

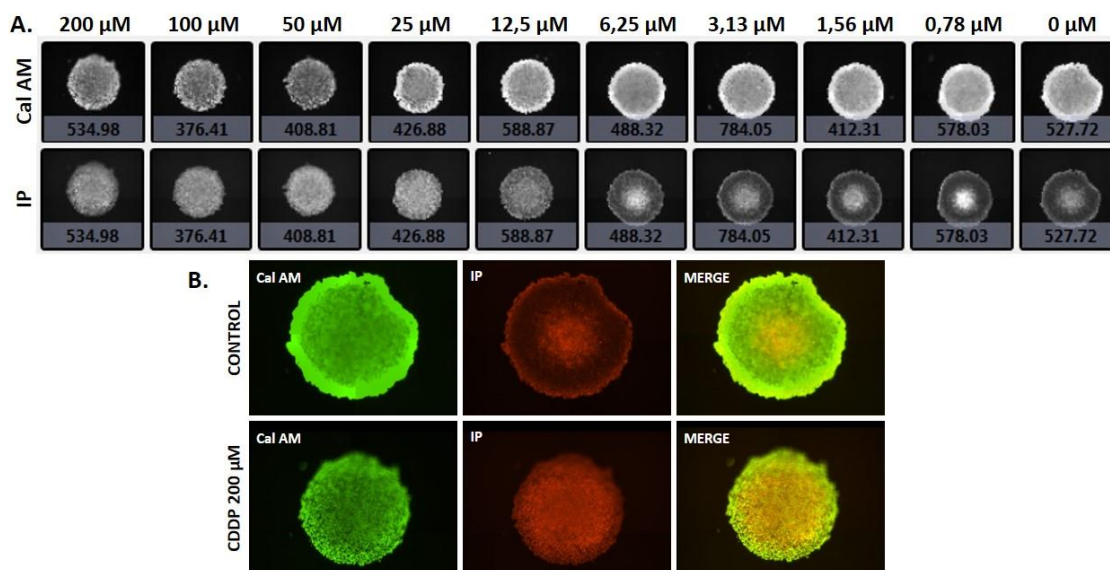
número de días de duración del experimento; como máximo, se decidió que los esferoides se tendrían en cultivo 14 días, sin sobrepasar un diámetro de 700  $\mu\text{m}$ . Con estos parámetros fijados, se determinó el número de células a sembrar en cada una de las líneas (Tabla 12).

### 5.3 Respuesta a CDDP.

#### 5.3.1 Cálculo del $\text{IC}_{50}$ .

Dada la importancia del desarrollo de resistencias a CDDP en las pacientes con CO, se calcularon los  $\text{IC}_{50}$  para dicho fármaco en cada una de las líneas celulares. Como control se utilizaron las tres líneas de superficie ovárica normal IOSE120, IOSE385 e IOSE386, que presentaron un  $\text{IC}_{50}$  medio de 2  $\mu\text{M}$ . Se estableció esta concentración como umbral de sensibilidad, y se clasificaron las líneas en 4 grupos atendiendo a su  $\text{IC}_{50}$ : células sensibles ( $\text{IC}_{50}$  entre 0-3  $\mu\text{M}$ ), células parcialmente resistentes ( $\text{IC}_{50}$  entre 3-6  $\mu\text{M}$ ), células resistentes ( $\text{IC}_{50}$  entre 6-12  $\mu\text{M}$ ) y células muy resistentes ( $\text{IC}_{50}$  superior a 12  $\mu\text{M}$ ).

En el caso de las células cultivadas en monocapa, el método utilizado para el cálculo del  $\text{IC}_{50}$  fue la tinción con SRB. Para dichos experimentos, la concentración máxima utilizada de CDDP fue 100  $\mu\text{M}$ , y 10 diluciones seriadas, incluyendo siempre un control de referencia sin CDDP. Para el cultivo en 3D esperábamos un aumento en la resistencia, y, por tanto, en el valor del  $\text{IC}_{50}$ , por lo que en este caso la concentración máxima empleada se aumentó a 200  $\mu\text{M}$ . Inicialmente, calculábamos la viabilidad de las esferas tras el tratamiento midiendo el diámetro de las mismas. Como se puede ver en la Figura 14, este método no es válido en todos los casos, ya que la esfera puede mantener un diámetro constante a pesar de contener células muertas en el interior de la misma. Por tanto, utilizamos la medida de la intensidad combinada de dos moléculas fluorescentes, el marcador CalAM (en verde) como medida de la viabilidad, y la tinción con IP (en rojo), como indicador de muerte celular. Las imágenes tomadas en respuesta a concentraciones crecientes de CDDP con el citómetro Celigo S indican que en las células control se observa una gran intensidad de CalAM, especialmente en los bordes de la esfera, que va disminuyendo a medida que aumenta la concentración de CDDP. En cuanto a las células muertas, en las esferas sin tratar, se localizan, principalmente, en el núcleo hipóxico de la esfera, mientras que su distribución es más homogénea a lo largo de la misma con las concentraciones crecientes de CDDP.



**Figura 14.** Viabilidad de esferas de la línea PEO23 tratadas con concentraciones decrecientes de CDDP. A. En el panel superior, las células teñidas con CalAM y en el inferior las células teñidas con IP. Al pie de las imágenes está indicado el diámetro de la esfera. B. Imágenes de fluorescencia de las esferas control (arriba) y máxima concentración de CDDP (abajo). Imágenes tomadas con el citómetro de placas CeligoS.

En cultivo tradicional en monocapa o 2D, la línea más resistente resultó ser PEA2, con un  $IC_{50} = 20,8 \mu M$ , y las más sensible fue OV56, con un  $IC_{50} = 1,5 \mu M$ , inferior a la media de las líneas control IOSE con un  $IC_{50} = 2 \mu M$ , como se ha comentado previamente. No encontramos asociación entre la sensibilidad a CDDP y el subtipo histológico de las líneas. En 3D únicamente calculamos el  $IC_{50}$  de las líneas que formaban esferas compactas (PEO16, OV56, SKOV3 y 59M), y la más resistente resultó SKOV3, con un  $IC_{50} = 45,3 \mu M$ , lo que supone un aumento de casi 4 veces con respecto a las células cultivadas en 2D. No obstante, el mayor aumento en la resistencia se obtuvo en la línea OV56, donde el  $IC_{50}$  aumenta 5,8 veces, de 1,5 a 8,7  $\mu M$ . La línea 59M mostró un ligero aumento en su  $IC_{50}$ , mientras que en las PEO16 el  $IC_{50}$  se mantuvo en torno a 5  $\mu M$  (Tabla 12 y Figuras 2 y 3 del documento Anexo).

Dado que la mayoría de las células no formaban esferas compactas, hicimos una aproximación diferente para ver los efectos del CDDP sobre células cultivadas en 3D. Para ello, se cultivaron las células en las placas ULA de fondo redondo durante 4 días, se disgregaron, y se volvieron a sembrar en monocapa (denominado cultivo post esferas). Tras 72 horas de tratamiento con CDDP se calculó el  $IC_{50}$ . En esta situación, 5 de las 16 líneas (PEO1, PEO6, PEO14, OV56 y 59M) aumentaron su  $IC_{50}$  tras el cultivo en 3D, y las restantes 11 líneas parecen sensibilizarse al CDDP tras ser cultivadas en 3D. Las líneas que más se sensibilizaron fueron dos de las más resistentes, PEA2 y A2780CIS, con unos descensos en el  $IC_{50}$  de 35 y 31 veces respectivamente. Estos datos se muestran en la Tabla 12.

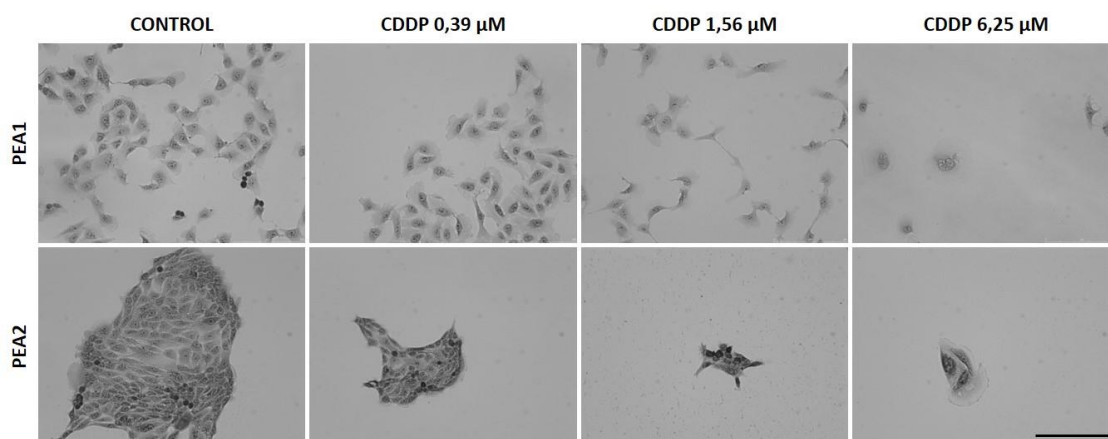


**Tabla 12.** Características de las líneas celulares tras el tratamiento con CDDP. Resist. CDDP = Grado de resistencia a CDDP (S = Sensible; PR = Parcialmente Resistente; R = Resistente; MR = Muy Resistente); IC<sub>50</sub> P.E. = IC<sub>50</sub> post esferas; % Sub G<sub>0</sub> IC<sub>50</sub> = Porcentaje de células encontradas en fase Sub G<sub>0</sub> del ciclo celular al tratar cada línea con su IC<sub>50</sub>. N.V. = No valorable.

Línea	IC <sub>50</sub>	Resist. CDDP	Nº células 3D	IC <sub>50</sub> 3D	IC <sub>50</sub> P.E.	% Sub G <sub>0</sub> IC <sub>50</sub>
A2780	3,51	PR	200		2,29	39,55
A2780CIS	13,84	MR	200		0,44	17,08
OVCAR3	5,01	PR	200		1,16	17,73
PEO1	5,52	PR	2000		12,69	16,52
PEO4	16,11	MR	2000		11,8	21,22
PEO6	11,94	R	2000		18,02	N.V.
PEA1	15,47	MR	500		1,9	45,33
PEA2	20,8	MR	500		0,59	47,57
PEO16	5,48	PR	4000	5,18	0,72	9,13
PEO14	2,68	S	2000		7,35	4,79
PEO23	10,37	R	200		8,285	7,6
TO14	10,43	R	200		6,37	8,63
OV56	1,51	S	5000	8,71	2,43	N.V.
OAW28	4,59	PR	5000		0,43	19,58
SKOV3	11,5	R	5000	45,27	6,08	N.V.
59M	9,47	R	10000	11,72	10,86	26,25

### 5.3.2 Efecto del CDDP sobre la formación de colonias.

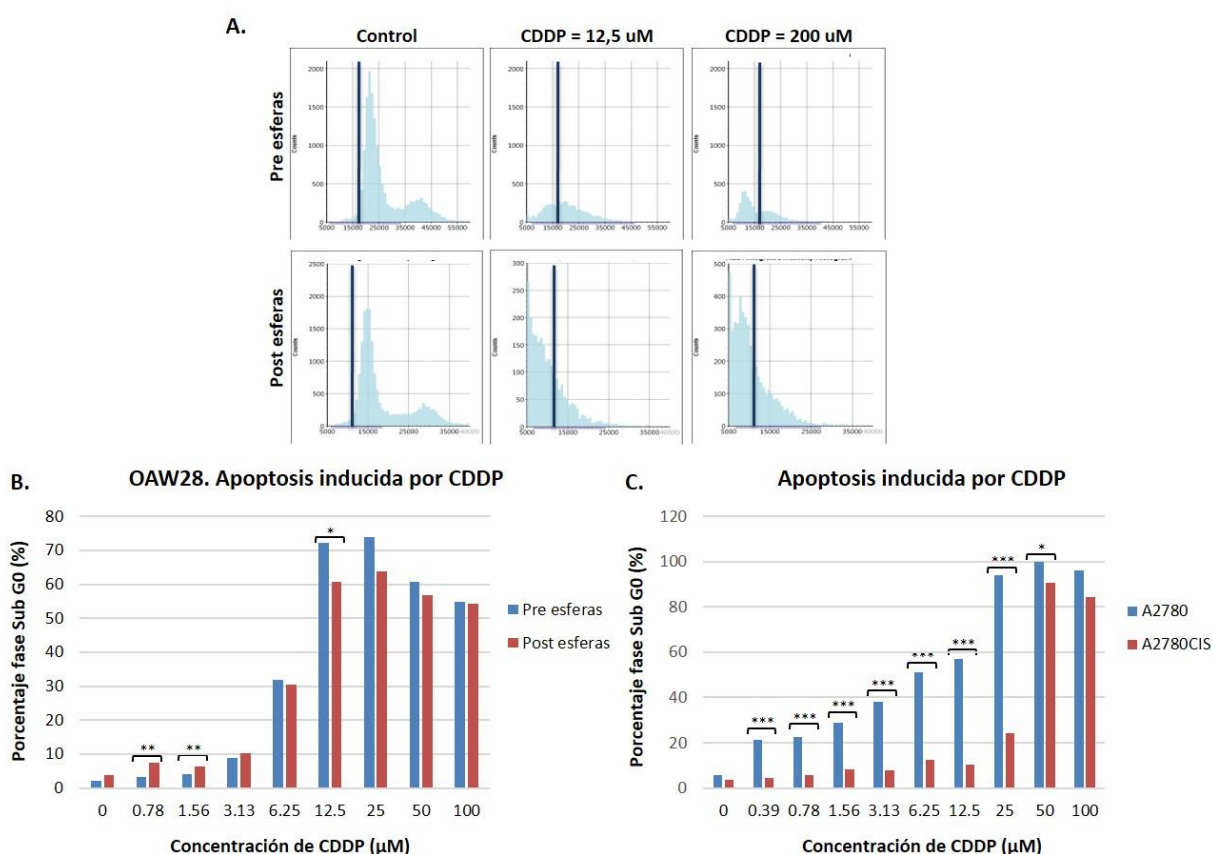
Analizamos los efectos del tratamiento con CDDP sobre la capacidad de formar colonias de las distintas líneas celulares. A medida que aumenta la concentración del fármaco, las células veían reducida su capacidad de formar colonias; no obstante, la morfología de las mismas no se veía afectada. La Figura 15 muestra, como ejemplo, las líneas PEA1 y PEA2. La máxima concentración de CDDP testada fue 100  $\mu$ M, pero a partir de 12,5  $\mu$ M las células perdían la capacidad de formar colonias.



**Figura 15.** Efecto del CDDP sobre la formación de colonias en las líneas celulares PEA1 y PEA2 (contraste de fases, 10X, barra de escala 250  $\mu$ m).

### 5.3.3 Efecto del CDDP sobre el ciclo celular.

Se estudió también el efecto de las distintas concentraciones de CDDP en el ciclo celular de las líneas, tanto en condiciones normales como en células que provenían de cultivo en 3D (post esferas). Tal y como esperábamos, el CDDP produjo notables alteraciones en todas las fases del ciclo y un aumento en el porcentaje de células apoptóticas (fase Sub G<sub>0</sub>), siendo el efecto más acusado en las células que provenían de post esferas. En las Figuras 16A y 16B se muestran como ejemplo los histogramas obtenidos para la línea OAW28, donde se ve el aumento en el número de células en apoptosis a concentraciones crecientes de CDDP. Además, hemos podido comprobar cómo en las líneas muy resistentes al platino (PEA1, PEA2 y A2780CIS) el porcentaje de muerte celular empieza a ser significativo a partir de 25  $\mu$ M (p-valor < 0,05), y en las líneas sensibles (PEO14) y parcialmente resistentes (A2780 y OAW28), estas diferencias significativas se obtienen con la exposición a las dosis mínimas de CDDP (p-valor < 0,05).



**Figura 16.** Efecto del tratamiento con CDDP sobre el ciclo celular. A. Histogramas de la línea OAW28. En la parte superior se muestra el de las células en condiciones normales, y en la parte inferior el de las células que provienen de esferas disgregadas (post esferas). Las células en apoptosis se localizan a la izquierda de la línea vertical que indica hipodiploidía. B. Porcentaje de células apoptóticas según la concentración de CDDP en la línea OAW28. C. Diferencias en la apoptosis entre las líneas A2780 y A2780CIS (Prueba t de Student: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001).

En la Figura 16C se muestra la comparación entre la línea A2780 y su línea derivada resistente a CDDP, A2780CIS, con menor porcentaje de células en apoptosis por la incubación con CDDP. La Tabla 12 recoge los porcentajes de células apoptóticas de cada línea al ser tratada con su  $IC_{50}$  de CDDP.

## 5.4 Invasión y Migración.

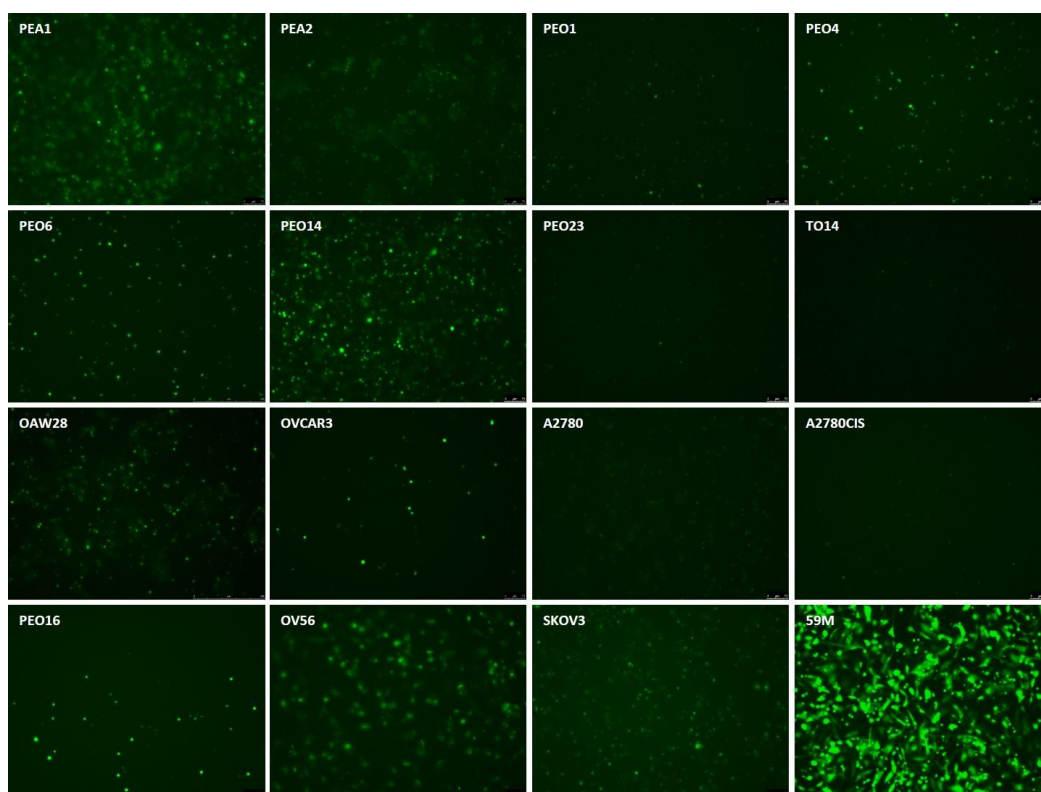
### 5.4.1 Invasión y Migración en 2D.

Los estudios de invasión y migración en cultivo en monocapa se realizaron utilizando el sistema de FluoroBlok™. Como se puede ver en la Figura 17, las líneas mostraron diferente capacidad migratoria. Se establecieron 3 grupos según la capacidad migratoria mostrada a las 24 horas de la exposición al quimioatrayente. El primer grupo lo forman las líneas que no migran: PEO23, TO14, A2780 y A2780CIS. El segundo grupo está formado por las líneas con capacidad migratoria intermedia, que aparecen en las imágenes como pequeños puntos brillantes que, en el momento de tomar la fotografía, se encontraban atravesando el poro. Este grupo está formado por las líneas PEO1, PEO4, PEO6, PEO16 y OVCAR3. El tercer y último grupo comprende a las líneas con alta capacidad migratoria, es decir, aquellas células que han atravesado el poro y han recuperado su morfología habitual. Estas líneas son PEA1, PEA2, PEO14, OAW28, OV56, SKOV3 y 59M.

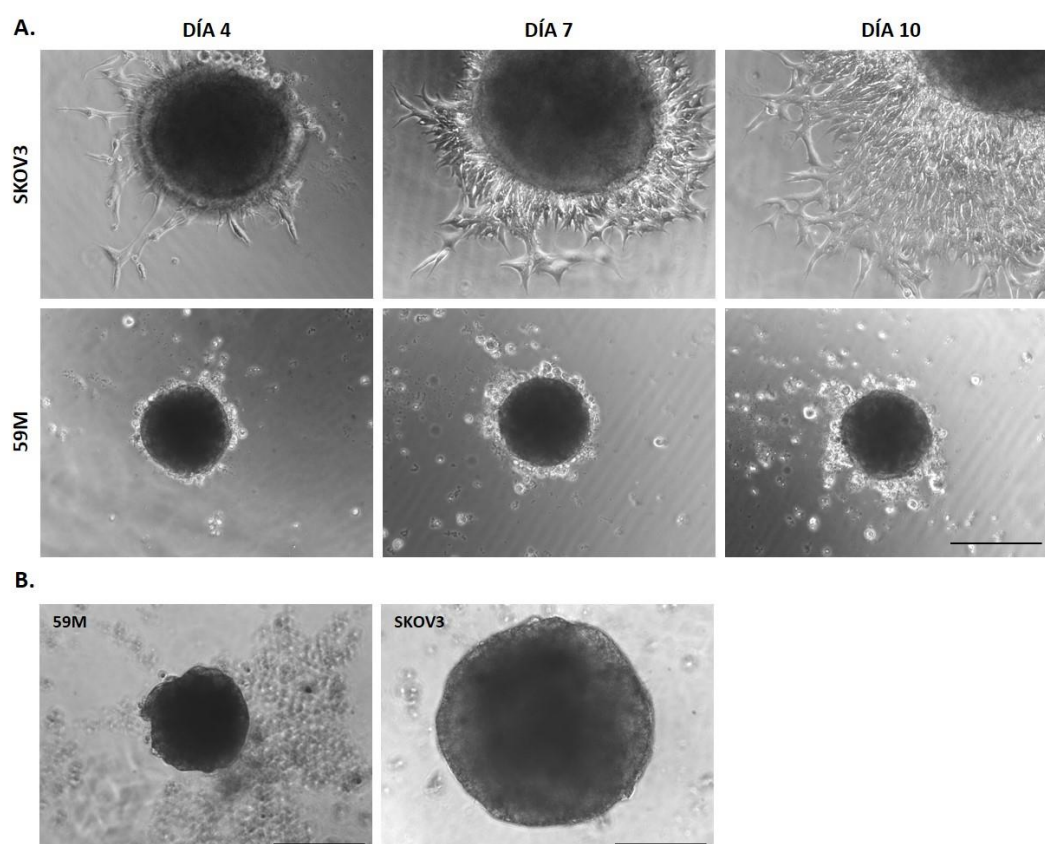
Los ensayos de invasión, en los cuales las células tienen que atravesar una capa de Matrigel antes de atravesar el poro, mostraron unos resultados prácticamente idénticos.

### 5.4.2 Invasión y Migración en 3D.

Utilizando las cuatro líneas celulares que forman esferas compactas, PEO16, OV56, SKOV3 y 59M, se realizaron estudios de invasión y migración en 3D. Las líneas PEO16 y OV56 no mostraron capacidad de invadir ni migrar sobre Matrigel. Las líneas SKOV3 y 59M mostraron distintas formas de migrar sobre Matrigel, como se muestra en la Figura 18A. La línea SKOV3 migraba extendiendo protuberancias filamentosas, proceso que denominamos migración de células individuales, mientras que la 59M lo hacía a través de pequeños grupos de células que se iban desprendiendo de la esfera principal, denominado migración colectiva. Además, la línea 59M dejaba de migrar a los 7-10 días, mientras que las SKOV3 mantenían el proceso activo, al menos, durante 14 días. Sin embargo, ni las SKOV3 ni las 59M mostraron capacidad para invadir en Matrigel (Figura 18B).



**Figura 17.** Migración celular de las líneas de CO a las 22 horas usando el sistema de FluoroBlok™.



**Figura 18.** Migración e invasión en 3D sobre Matrigel de las líneas SKOV3 y 59M. A. Migración de las esferas a los 4, 7 y 10 días. B. Invasión de las esferas a los 10 días (contraste de fases, 10X, barra de escala 250  $\mu$ m).

## 6. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE MARCADORES DE TEM.

Analizamos la expresión, a nivel de proteína, de los genes que aparecen en los perfiles de supervivencia y de los principales marcadores de TEM en tejido tumoral y en las líneas celulares. Se han analizado marcadores epiteliales (ECAD y PANCK), mesenquimales (NCAD y VIM) y reguladores de la transcripción (Snail, Slug, Twist, Zeb1 y Zeb2). La expresión de Twist1, CDH11 y PIK3R no se pudo valorar por IHQ dado que los anticuerpos no funcionaban correctamente; en todos los casos la tinción era difusa y muy intensa.

### 6.1 IHQ en tejido tumoral.

En base a la expresión del marcador epitelial ECAD y el marcador mesenquimal NCAD clasificamos a las pacientes en 3 fenotipos: epitelial (17,4%), intermedio (62,3%) y mesenquimal (20,3%).

Las frecuencias observadas para cada una de las proteínas analizadas se muestran en las Tablas 13 (genes de los perfiles de supervivencia) y 14 (reguladores de la TEM). En NCAD se observó tinción nuclear en el 10% de los casos, y también se observó tinción citoplásmica de BCAT en el 7% de los casos analizados. No obstante, a efectos del tratamiento estadístico, únicamente se consideró la tinción de membrana. La expresión de PANCK era difusa en la membrana de todos los casos, por lo que no fue incluida en los análisis estadísticos.

**Tabla 13.** Frecuencias de las proteínas obtenidas en la IHQ sobre tejido tumoral con los genes implicados en los perfiles de supervivencia. C = citoplasma; E = estroma; N = núcleo, T = tumor.

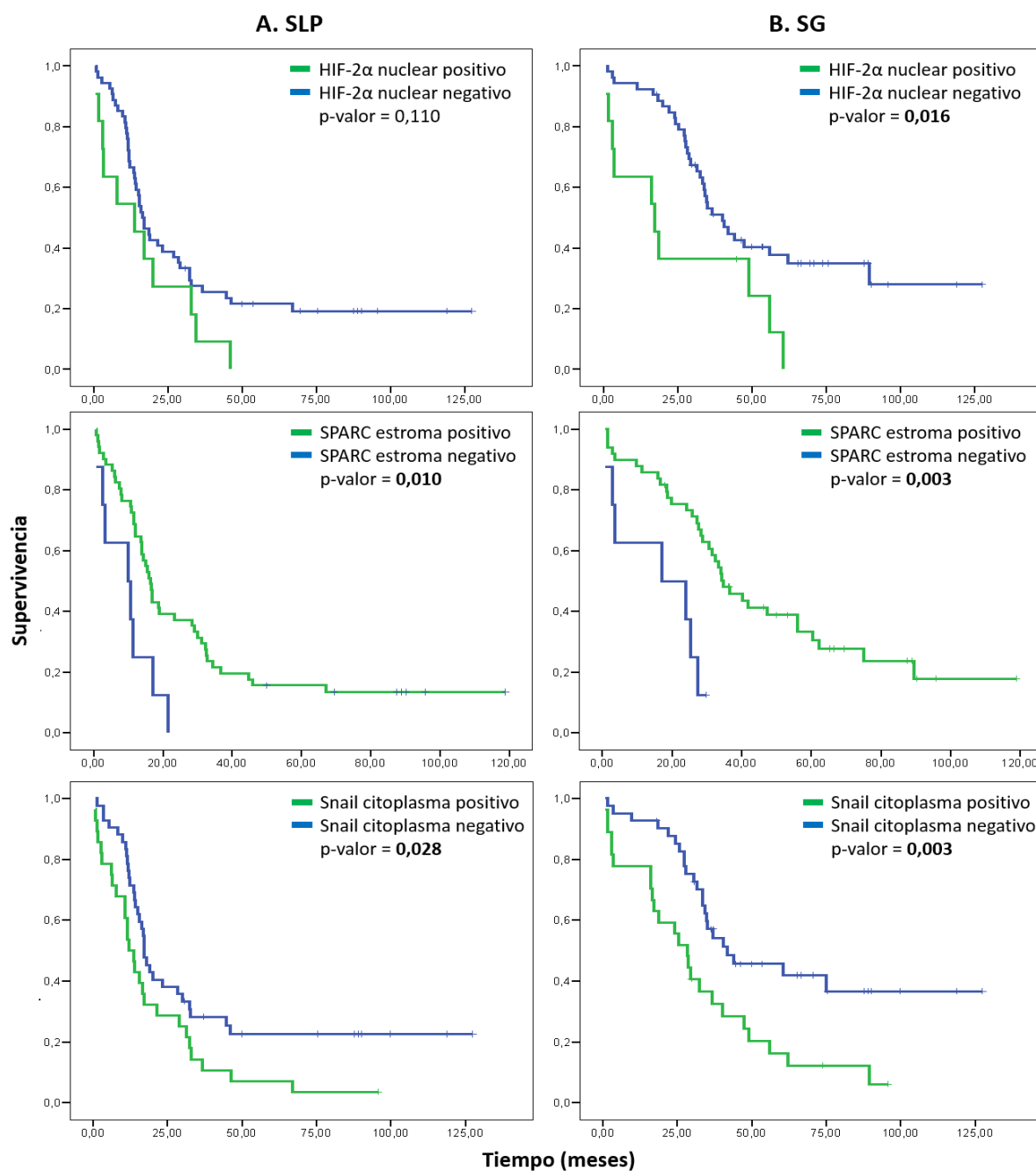
Proteína	Valoración	N	Porcentaje (%)	Proteína	Valoración	N	Porcentaje (%)
BCAT	Positivo	57	81,4	SLC39A6	Positivo	31	52,5
	Negativo	13	18,6		Negativo	28	47,5
HIF-2α citoplasma	Positivo	12	17,6	SNAI3	Focal	10	14,7
	Negativo	56	82,4		Difuso	58	85,3
HIF-2α núcleo	Positivo	49	73,1	ID4	0	12	16,9
	Negativo	18	26,9		1	35	49,3
HGF	Positivo	14	20,9		2	24	33,8
	Negativo	53	79,1	MET	Focal	22	26,8
SPARC tumor	Positivo	6	9,5		Difuso	19	23,2
	Negativo	57	90,5		Negativo	41	50
SPARC estroma	Positivo	52	85,2	VHL	Focal	28	40,6
	Negativo	9	14,8		Difuso	28	40,6
					Negativo	13	18,8

**Tabla 14.** Frecuencias de las proteínas obtenidas en la IHQ sobre tejido tumoral con los principales marcadores de TEM. C = citoplasma; E = estroma; N = núcleo, T = tumor.

Proteína	Valoración	N	Porcentaje (%)	Proteína	Valoración	N	Porcentaje (%)
ECAD	Positivo	13	16,7	VIM	Positivo	24	38,1
	Negativo	65	83,3		Negativo	39	61,9
NCAD	Positivo	15	21,4	ZEB1 (T)	Positivo	26	34,2
	Negativo	55	78,6		Negativo	50	65,8
SNAIL (C)	Positivo	30	41,1	ZEB1 (E)	Positivo	36	48
	Negativo	43	58,9		Negativo	39	52
SNAIL (N)	Positivo	41	55,4	ZEB2 (T)	Positivo	16	30,8
	Negativo	33	44,6		Negativo	36	69,2
SLUG	Positivo	64	85,3	ZEB2 (E)	Positivo	9	18,4
	Negativo	11	14,7		Negativo	40	81,6

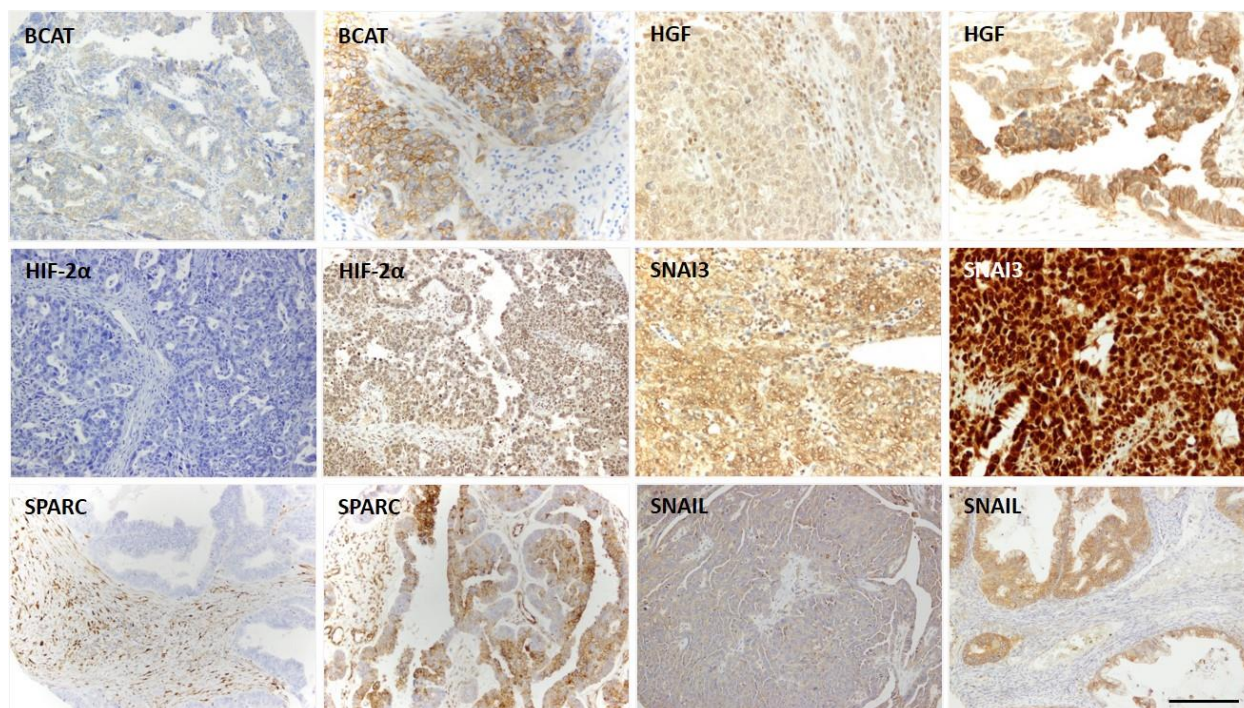
Se realizó un análisis univariante mediante regresión de Cox para relacionar la expresión de estas proteínas con la supervivencia de las pacientes (Tabla 6 del Anexo). De los genes implicados en los perfiles, encontramos relación entre la expresión de HIF-2 $\alpha$  núcleo con la SG, HR = 2,42 (I.C. 95% 1,18 – 4,96 p-valor = 0,016) y la expresión de SPARC en las células del estroma tumoral tanto con la SLP, HR = 0,36 (I.C. 95% 0,16 – 0,78; p-valor = 0,010) como con la SG, HR = 0,26 (I.C. 95% 0,11 – 0,63; p-valor = 0,003). Para la expresión de los reguladores de TEM, sólo la expresión citoplásmica de Snail mostró una asociación estadísticamente significativa, tanto con la SLP, HR = 1,78 (I.C. 95% 1,06 – 2,97; p-valor = 0,028) como con la SG, HR = 2,36 (I.C. 95% 1,33 – 4,19; p-valor = 0,003). Las curvas KM de supervivencia para estas tres proteínas se muestran en la Figura 19.

La Figura 20 muestra ejemplos de los diferentes patrones de tinción observados con los 5 genes comunes a los perfiles de expresión además de Snail, que mostró ser un gen importante relacionado con la supervivencia. Siempre que había tinción tumoral de SPARC, ésta iba acompañada de tinción en el estroma adyacente.



**Figura 19.** Curvas KM de supervivencia para proteínas analizadas mediante IHQ. A. SLP, B. SG. Panel superior HIF-2 $\alpha$  nuclear, panel central SPARC en estroma tumoral y panel inferior Snail en citoplasma.





**Figura 20.** Patrones de expresión proteica de 5 de los genes comunes en los perfiles de supervivencia y Snail en cáncer de ovario (20X, barra de escala 200  $\mu$ m).

En cuanto a la asociación de la expresión de estas proteínas con las variables clínicas analizadas, el análisis de regresión únicamente relacionó la presencia de ID4 con el subtipo histológico seroso de alto grado, donde aparece como un factor de riesgo, OR = 4,23 (I.C. 95% 1,37 – 19,09; p-valor = 0,027), y la presencia en células del estroma tumoral de SPARC, OR = 2,5 (I.C. 95% 1,11 – 6,41; p-valor = 0,036) y Zeb1, OR = 0,23 (I.C. 95% 0,06 – 0,80; p-valor = 0,027), con la presencia de ascitis, donde el primero es considerado un factor de riesgo y el segundo un factor protector.

## 6.2 IHQ en líneas celulares.

Realizamos IHQ de los principales marcadores de TEM en las líneas celulares de CO. Para la valoración de las cadherinas, VIM y pancitoqueratina (PANCK) se tuvo en cuenta la tinción en membrana (Ausente, Conservada, Reducida). En el caso de Snail y Slug se valoró la tinción citoplasmática, mientras que para ZEB1 y ZEB2 se valoró tinción nuclear. Los resultados se muestran en la Tabla 15.

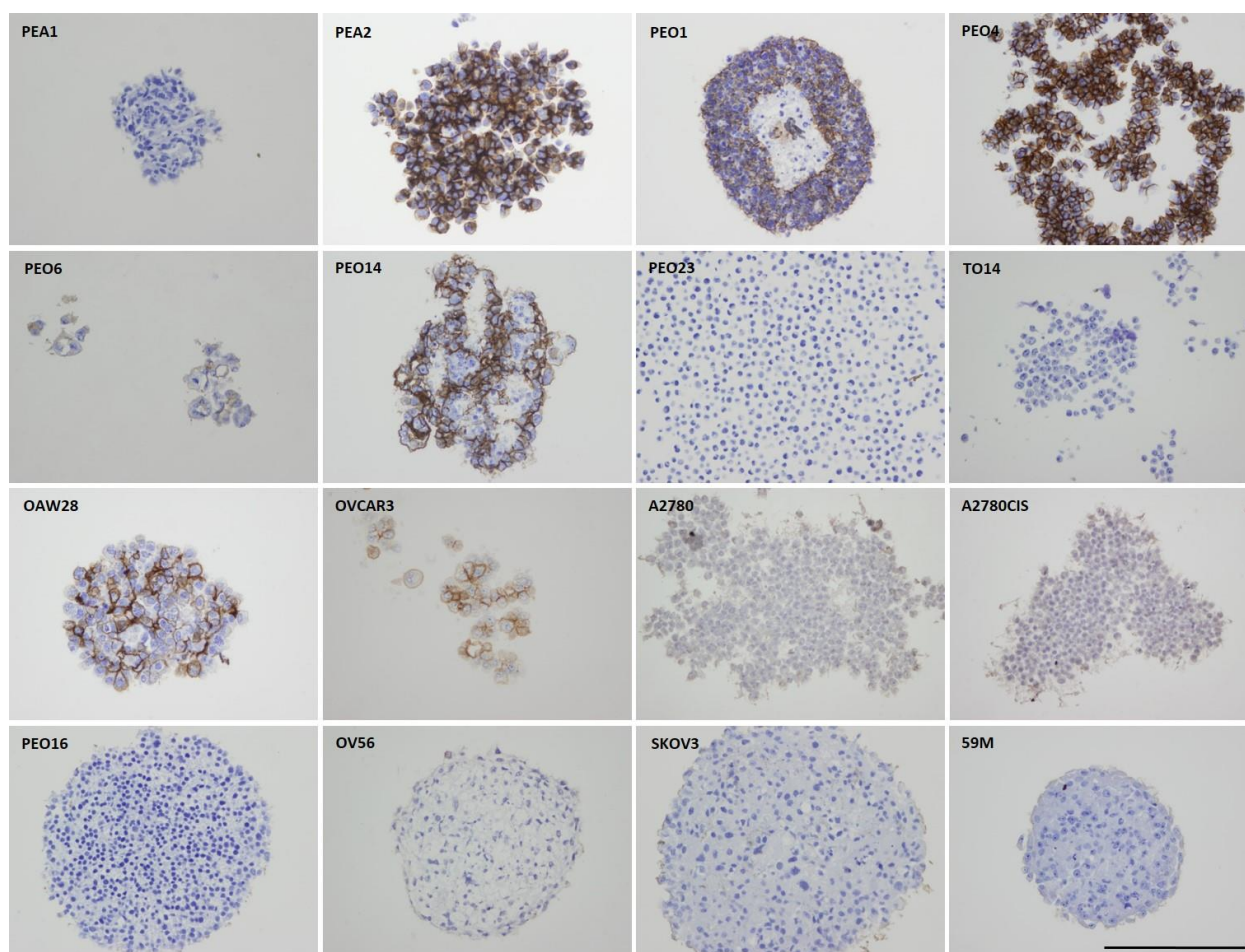
La clasificación fenotípica de las líneas se realizó atendiendo a la expresión de los marcadores epiteliales, ECAD y PANCK, y de los marcadores mesenquimales NCAD y VIM. De esta manera, las líneas puramente epiteliales resultaron ser PEO4, PEO6, OAW28 y OVCAR3, y las mesenquimales PEO23, TO14, PEO16, A2780 y A2780CIS. El resto presentan un fenotipo



intermedio, epitelial o mesenquimal, ya que muestran tinción de ambos marcadores. Para los cuatro marcadores se consideró tinción positiva tanto la conservada como la reducida (Tabla 15). Ninguna de las cuatro líneas que forma esferas compactas (PEO16, OV56, SKOV3 y 59M) muestra inmunorreactividad frente a ECAD (Figura 21).

**Tabla 15.** Valoración de los principales marcadores de TEM en las líneas celulares de CO. Tipo de esfera que forman: AL = agregado laxo; AC = agregado compacto; EC = esfera compacta. IHQ: A = ausente, C = conservada; R = reducida; + = positivo; - = negativo; \* = tinción nuclear. Fenotipo: E = epitelial, EI = epitelial intermedio, I = intermedio, M = mesenquimal, MI = mesenquimal intermedio.

Línea	Histología	Tipo de esfera	ECAD		NCAD		PANCK		VIM		SNAIL		SLUG		ZEB1		ZEB2		Fenotipo	
			2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D
PEA1	HGS	AL	A	A	A	A	C	R	C	C	-	+	-	+	-	+	-	+	I	MI
PEA2	HGS	AL	R	C	A	A	C	C	R	R	-	-	-	+	-	-	-	+	EI	EI
PEO1	HGS	AC	R	R	A	A	C	C	R	R	-	-	-	+	-	-	-	+	EI	EI
PEO4	HGS	AC	R	C	A	A	C	C	A	A	-	-	-	-	-	-	+	-	E	E
PEO6	HGS	AC	R	R	A	A	C	C	A	A	-	+	-	+	-	-	-	-	E	E
PEO14	HGS	AC	R	R	A	R	C	R	R	R	+	+	-	+	-	+	-	-	EI	I
PEO23	HGS	AL	A	A	A	A	A	A	C	C	-	+	-	+	+	+	-	+	M	M
TO14	HGS	AL	A	A	A	A	A	A	C	C	-	+	-	-	+	-	-	+	M	M
OAW28	HGS	AL	R	R	A	A	C	C	A	A	+	+	-	-	-	-	-	-	E	E
OVCAR3	HGS	AL	R	R	A	A	C	C	A	A	+	+	-	-	-	-	-	-	E	E
PEO16	HGS/LGS	EC	A	A	C	C	A	A	C	R	-	-	-	-*	-	+	-	+	M	M
A2780	E/CC	AL	A	A	R	R	A	A	C	C	+	+	+	-	-	+	-	+	M	M
A2780CIS	E/CC	AL	A	A	R	R	A	A	C	C	+	+	+	-	-	+	-	+	M	M
OV56	E/CC	EC	A	A	R	R	R	C	C	C	+	+	-	+	-	+	+	+	MI	MI
SKOV3	E/CC	EC	A	A	R	R	C	R	C	C	-	+	-	+	+	+	-	-	MI	MI
59M	Mx	EC	A	A	C	C	C	R	C	C	+	-	-	-	-	+	-	-	MI	MI



**Figura 21.** IHQ con ECAD en las líneas celulares cultivadas en 3D (40X, barra de escala 100  $\mu$ m).

Al igual que en tejido tumoral, y habiendo detectado diferencias significativas entre algunos de los marcadores y la supervivencia, se estudiaron también los marcadores comunes a ambos modelos de supervivencia en el panel de líneas celulares de CO (Tabla 16). La valoración se realizó de manera similar al tejido. HGF, en células cultivadas en 2D únicamente mostraba tinción citoplasmática, mientras que al cultivar las células en 3D encontramos también tinción nuclear y de membrana. En el caso de SPARC, se valoró la tinción de citoplasma, que en todos los casos positivos es focal, salvo en las 59M que muestra una tinción difusa.

En líneas generales, se observa una tendencia en el aumento de los marcadores estudiados al cultivar las células en 3D en comparación con el cultivo tradicional en monocapa, aunque no se obtienen diferencias significativas para ninguno de ellos. Este hecho es especialmente evidente en el caso de SNAI3, donde la expresión aumenta en todos los casos, y también en la expresión de HIF-2 $\alpha$ , donde aumenta la expresión en 11 de las 16 líneas. Los resultados se muestran en la Tabla 16. Estas proteínas también se estudiaron mediante WB,

pero los resultados obtenidos fueron muy diversos y no significativos entre todas las líneas celulares.

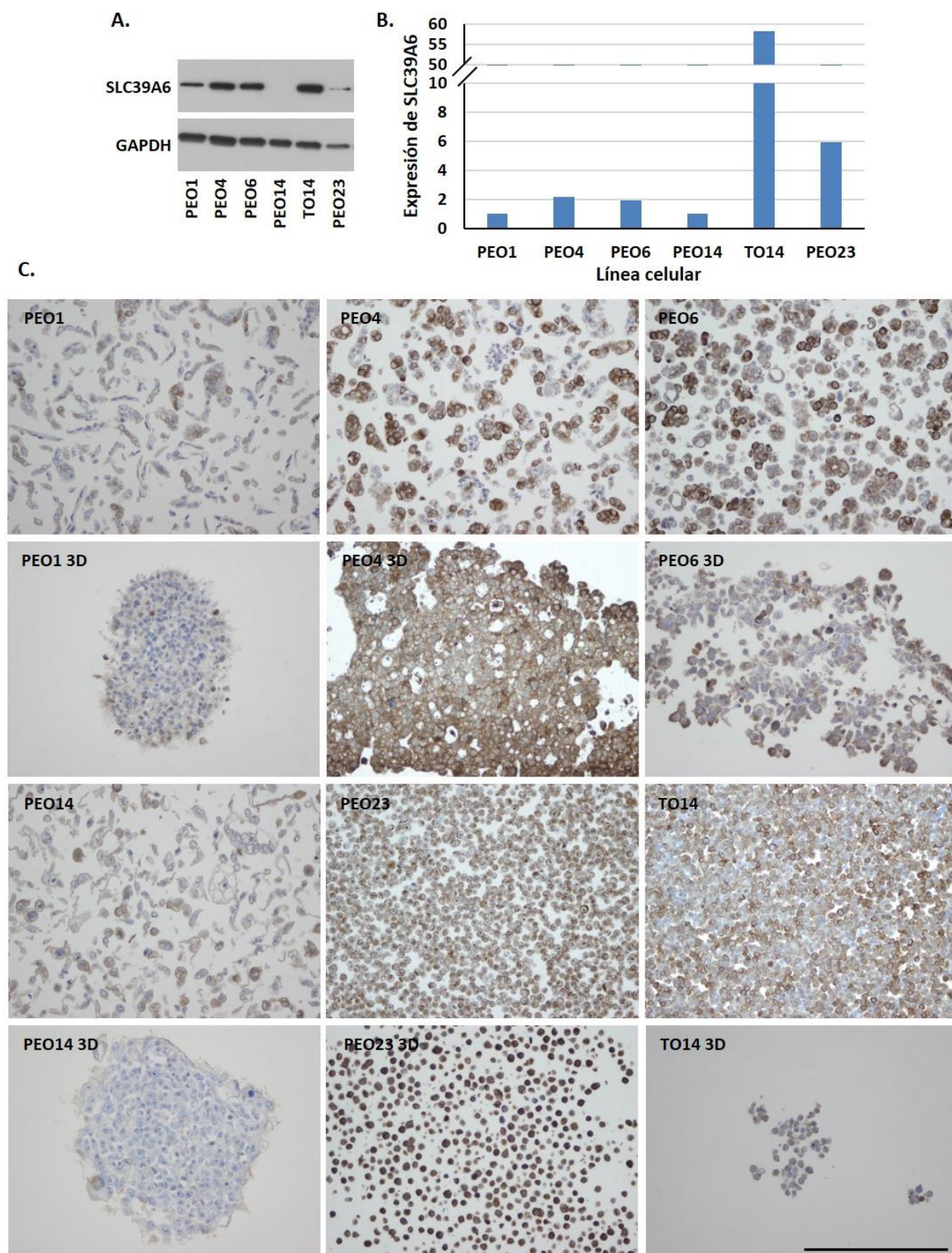
**Tabla 16.** Valoración IHC en las líneas celulares de CO de los 5 genes comunes a los perfiles de supervivencia. IHQ: A = ausente, C = conservada; R = reducida; Cit. = citoplasma, MB = membrana; N = núcleo; + = positivo; - = negativo.

Línea	BCAT		HGF		HIF-2 $\alpha$		SNAI3		SPARC	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D
PEA1	R	C	+	+	-	+	-	++	-	-
PEA2	R	R	+	-	-	-	-	++	-	+
PEO1	C	C	-	+	-	+	+	++	-	-
PEO4	C	C	-	+	-	-	-	++	-	+
PEO6	C	R	-	+	-	-	-	++	-	+
PEO14	R	C	+	+	-	-	-	++	-	+
PEO23	A	A	+	+	-	+	-	++	-	-
TO14	R	A	-	+	-	+	+	++	-	-
OAW28	A	A	+	+	-	+	+	++	+	-
OVCAR3	R	R	-	+	-	+	+	++	-	-
PEO16	R	R	-	-	-	+	+	++	-	+
A2780	R	R	-	+	-	+	-	++	-	-
A2780CIS	R	R	-	+	-	+	-	++	-	-
OV56	R	C	+	+	-	-	-	++	+	-
SKOV3	R	R	-	+	-	+	-	++	-	-
59M	R	R	-	-	-	+	-	++	+	+

## 7. SLC39A6

El estudio del gen y la proteína SLC39A6 nos pareció interesante dado que la expresión génica es, junto a *CTNNB1*, la única que muestra una asociación independiente con la SLP (HR = 1,37) y, al generar el perfil génico, aparece como la variable de mayor impacto, con un HR = 2,2. Por ello, lo consideramos un factor de riesgo.

En líneas celulares, se analizó la expresión proteica mediante IHQ y WB. Como se puede ver en la Figura 22, se produce un aumento de SLC39A6 en las líneas celulares que provienen de una recaída, PEO4, PEO6 y PEO23, frente a las ascitis recogidas en un momento anterior, PEO1 y PEO14. Por WB, la mayor expresión la obtenemos en la línea TO14, que proviene de una metástasis en el omento, aunque este aumento tan significativo no se aprecia mediante IHQ. Además, PEO14, que no ha recibido tratamiento previo, no expresa la proteína. No se observaron diferencias de expresión en cultivo 3D frente a 2D. En el análisis de expresión génica mediante RT-qPCR se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados).



**Figura 22.** Análisis de expresión proteica de SLC39A6 en *pellet* y esferas. A. WB; se usa GAPDH como control endógeno. B. Cuantificación del WB. C. IHQ (40X, barra de escala 100  $\mu$ m).

## V. DISCUSIÓN



## 1. GENERACIÓN DE MODELOS DE SUPERVIVENCIA.

### 1.1 Aspectos metodológicos y análisis estadístico.

En este estudio se han definido dos perfiles de expresión génica relacionados con la TEM a partir de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina mediante la técnica de RT-qPCR. Este tipo de estudios requiere un diseño riguroso y un análisis estadístico detallado que permita analizar exhaustivamente la gran cantidad de datos que se generan. Por este motivo es necesaria la colaboración de un equipo multidisciplinar que cuente con patólogos, oncólogos, biólogos moleculares y bioestadísticos.

Hasta hace relativamente poco tiempo, todos los ensayos de expresión génica se realizaban con material obtenido de muestras en fresco, con la dificultad que ello conlleva. Las muestras parafinadas son la manera estándar de conservación en los hospitales, pero presentan dos inconvenientes: en primer lugar, en estas muestras la cantidad de material genético disponible es limitada, y, en segundo lugar, el material genético obtenido suele estar degradado por el proceso de fijación con formol (253). Actualmente esto no representa una limitación, ya que la optimización de los métodos de extracción ha dado lugar al desarrollo de kits comerciales con alto rendimiento para este tipo de muestras. El problema de la degradación se ha resuelto con técnicas como la RT-qPCR, que necesita poco tejido y permite la amplificación de fragmentos cortos, proporcionando resultados cuantitativos, precisos y reproducibles, por lo que se ha convertido en la técnica más utilizada para la validación de biomarcadores (254, 255). Gracias a estos avances, en el año 2004 se publicaron los primeros estudios de expresión génica mediante RT-qPCR a partir de muestras parafinadas en cáncer de mama (256, 257). El test comercial con valor pronóstico en cáncer de mama, Oncotype DX®, mencionado anteriormente, utiliza esta metodología y analiza la expresión de un panel de 21 genes para predecir la probabilidad de recidiva en pacientes con carcinoma infiltrante en estadio inicial e identificar así a las pacientes que van a obtener un mayor beneficio al tratamiento con quimioterapia (94).

Los *microarrays* representan la técnica más utilizada en la generación de modelos génicos, ya que presentan la ventaja de permitir el análisis, incluso, del genoma completo, evitando así los sesgos introducidos por la selección individual de genes, pero los resultados obtenidos pueden ser muy variables dependiendo de factores como el procesamiento de las muestras y la plataforma empleada. Además, necesitan sistemas bioinformáticos dirigidos para el análisis de los resultados (258). La utilización de tarjetas TLDA permite el estudio simultáneo de un gran número de genes y al estar preparadas de manera comercial, se reduce la variabilidad, lo que permite obtener resultados más reproducibles. Dada la cantidad de datos

generados en este tipo de estudios, es esencial aplicar una metodología estadística robusta. En este sentido, la principal limitación para el análisis estadístico que muestra nuestro estudio es el reducido tamaño muestral ( $N = 84$ ). Además, al tener un número elevado de variables, 43 genes, muchos de ellos con un alto nivel de correlación, aumenta la probabilidad de generar perfiles de expresión diferenciales debidos al azar.

Para la selección de las variables implicadas en el proceso de TEM que pudieran estar relacionadas con el subtipo histológico seroso de alto grado, se realizó un análisis univariante y se aplicó el test de FDR como corrector para comparaciones múltiples. En nuestro caso, dado que todos los análisis se realizan sobre la misma muestra, la probabilidad de incluir falsos positivos aumenta, y el test FDR se encarga de discriminar cuales lo son de verdad (246, 259). Ninguna de las variables analizadas resultó estar asociada con el subtipo HGSOC y, por tanto, se decidió incluir todos los casos para la generación de los modelos de supervivencia, sin limitarse a un subtipo histológico concreto. Aun siendo conscientes de que existen diferencias entre ellos, la exclusión de otros subtipos supondría una reducción en el número de pacientes, ya de por sí limitado. Por ello y por las conclusiones de este estudio preliminar en el que no se encuentran diferencias entre subtipos decidimos incluir todos los casos de la serie.

Para la generación de los modelos de supervivencia se realizó un análisis mediante regresión de Cox con cada una de las variables y, adicionalmente, se emplearon los métodos de regresión penalizada de Lasso y Boosting, con el fin de aumentar la precisión del modelo y reducir la varianza. El método Lasso añade una penalización Lambda o “factor de disminución” sobre la suma de los coeficientes que permite imponer más o menos penalización y que, a su vez, se optimiza para cada modelo (248). Considerando que todas las muestras se emplearon para generar el modelo, la precisión estimada del perfil podría estar sobreestimada, por lo que se aplica una validación interna cruzada (*Leave-One-Out Cross Validation*) (260). El método Boosting, como se ha visto en nuestros resultados, donde incluye un mayor número de genes, es un método menos restrictivo, que aplica para la generación de modelos un algoritmo que permite aumentar la precisión en la predicción cuando el número de variables a analizar es elevado respecto al número de muestras (249). Existen otros métodos de regresión lineal múltiple alternativos para el estudio de variables correlacionadas y alta dimensionalidad; entre ellos se incluyen el análisis de componentes principales (261), la regresión de mínimos cuadrados parciales (262) y la regresión contraída (*ridge regression*) (263), que fueron descartados ya que no permiten la selección de variables que realiza Lasso, evitando la colinealidad y aumentando el poder de predicción del modelo (260, 264). El método de pasos sucesivos (*stepwise*) también se descartó por su baja capacidad predictiva (260, 265).

En este tipo de estudios, para comprobar que los marcadores son robustos y no han sido seleccionados por azar debido al elevado número de variables, se debe realizar una validación en una serie independiente. Como abordaje intermedio, existen técnicas de remuestreo de los casos de la serie sobre la que se ha generado el modelo, para estimar mejor el error de clasificación y la capacidad predictiva del modelo, como la validación cruzada (260). Pero definitivamente, para que un perfil génico pueda ser utilizado en la clínica ha de ser validado en una serie independiente que confirme su capacidad pronóstica. Cuando las series de validación son difíciles de obtener, existe como alternativa la validación *in silico*, sobre los datos publicados de otros autores. Existen actualmente varias plataformas disponibles que posibilitan dichas validaciones sobre los datos de grandes series de carcinoma de ovario (250, 266). La robustez de la metodología estadística empleada para la generación de los modelos de supervivencia, ha permitido que ambos modelos hayan sido validados *in silico* en una serie independiente. Dicha validación se ha llevado a cabo utilizando la serie de pacientes de Tothill y colaboradores, compuesta por 285 pacientes con CO, carcinoma primario peritoneal o carcinoma de trompas de Falopio (36). Esta serie tiene un número de pacientes amplio, y consolida el valor pronóstico de nuestros modelos. No obstante, esta plataforma no contempla la aplicación de coeficientes sobre las variables seleccionadas y, por tanto, genera un perfil lineal. Además, no permite la selección dentro de la serie analizada, por lo que comprende pacientes en todos los estadios de la enfermedad (I-IV) y con distintos tratamientos. Por tanto, aunque los resultados parecen interesantes, para poder conseguir su aplicación en la clínica, los modelos deberían ser validados en una serie prospectiva dentro de un ensayo clínico.

### 1.3 Descripción de la muestra de estudio.

La serie de pacientes utilizada para llevar a cabo este estudio muestra las características habituales del CO avanzado. La media de edad en nuestra serie, 57 años, es sólo 3 años menor que la mediana de la población global, 60 años. El 65% de las pacientes presentaban un tumor seroso de alto grado, dato similar al 70% de la población diagnosticada de esta enfermedad. Otro aspecto importante en nuestra serie es la homogeneidad del tratamiento utilizado, ya que todas las pacientes fueron sometidas a una cirugía citorreductora y recibieron al menos 6 ciclos de quimioterapia con carboplatino y paclitaxel. El 42% de las pacientes tuvo una cirugía óptima, un dato inferior al descrito por otros autores (86, 267). La tasa de respuesta al tratamiento fue del 63%; no obstante, como es habitual, más del 80% de las pacientes tuvieron una recaída durante el periodo de estudio y el 67% falleció a causa de la enfermedad, datos también similares a los descritos en otros estudios (69, 102). Por tanto, a



pesar de tratarse de una serie pequeña, es homogénea y representativa de la población general de las pacientes diagnosticadas con cáncer de ovario avanzado.

A la hora de plantear estudios de perfiles de expresión en cáncer de ovario, también es importante la homogeneidad de la muestra en cuanto a los subtipos histológicos y al tratamiento recibido. Aunque actualmente el tratamiento que reciben las pacientes es el mismo, independientemente del subtipo histológico que presenten, las pacientes no responden de la misma manera. Un estudio reciente ha demostrado que el subtipo histológico es el factor que ejerce una mayor influencia en la expresión génica (268). No obstante, estudios anteriores ya eran capaces de diferenciar el subtipo histológico según sus perfiles de expresión, especialmente para el CCC (269, 270). Esta es una de las limitaciones de nuestra serie de pacientes, que comprende pacientes de todos los subtipos, aunque para los estudios de supervivencia, los resultados estadísticos nos permitieron agrupar a todas las pacientes ya que no hemos encontrado diferencias en cuanto a los genes de TEM seleccionados, pudiendo aumentar así el tamaño muestral.

## 1.4 Variables analizadas.

### 1.4.1 Variables clínicas.

La cirugía óptima es la única de las variables clínicas estudiadas en este trabajo que ha mostrado un valor pronóstico independiente en la serie de pacientes analizada, lo que está en concordancia con otros trabajos en los que aparece como un indicador de supervivencia (86, 271). Como era de esperar, las pacientes que tuvieron una cirugía óptima mostraron mayor SLP y mayor SG que las pacientes que tuvieron una cirugía subóptima. Dada la importancia de esta variable, son muchos los grupos que están evaluando la importancia de lograr una resección completa (R0) en la cirugía citorreductora frente a una cirugía óptima, y se está planteando la posibilidad de realizar una laparotomía exploratoria previa a la intervención para identificar aquellas pacientes que no lograrían una cirugía óptima y podrían beneficiarse de un tratamiento con quimioterapia neoadyuvante (272). Los principales trabajos han sido llevados a cabo por el grupo de Fagotti y colaboradores, que han creado un índice con valor pronóstico (PIV) según lo observado en la laparotomía, para identificar las pacientes que se podrían beneficiar de una cirugía citorreductora (273, 274). Actualmente hay dos ensayos clínicos abiertos, SCORPION (NCT01461850) y MISSION (NCT02324595), para evaluar los riesgos y beneficios que pueda tener la laparotomía exploratoria.

Otras variables como el grado del tumor o el subtipo histológico, considerados factores de riesgo, pudieron no mostrar significación estadística debido a que la mayoría de los casos

eran de alto grado y debido también al reducido tamaño muestral, que supone una limitación para estudios de estas características. Tampoco hemos encontrado diferencias en cuanto a la respuesta al tratamiento relacionadas con la expresión de genes de TEM. Esto resulta llamativo dada la gran cantidad de estudios que han relacionado este proceso con el desarrollo de resistencia a CDDP y paclitaxel en CO (126, 275, 276), y en otros tipos de cáncer como pulmón, hígado y páncreas (277-279). No obstante, es importante recalcar que estamos hablando del efecto de una combinación de genes y no del efecto que pueda tener cada uno de ellos de manera individual.

#### 1.4.2 Variables génicas.

En base a la literatura existente en el comienzo de este estudio, se seleccionaron 43 genes relacionados con el CO o cuya implicación en el proceso de TEM en distintos tipos de cáncer estuviera documentada. Están incluidos la mayoría de marcadores clásicos de TEM (SNAIL, ZEB, TWIST, cadherinas, etc.), de los que disponemos de una gran cantidad de información dada su implicación directa en el proceso, y también otros tantos genes que podrían modularlo a través de distintos mecanismos y vías de regulación.

La correlación entre las variables génicas en este tipo de estudios puede suponer un problema a la hora de realizar los análisis estadísticos y puede dar lugar a la inclusión de falsos positivos. No obstante, al tratarse de un estudio sobre un proceso concreto, la TEM, la correlación entre los genes seleccionados era inevitable, y por este motivo se aplicaron diferentes métodos estadísticos que pudieran corregir esta limitación. En cualquier caso, también encontramos niveles de correlación no excesivamente altos (cerca de 1), que podrían explicarse porque estos genes, a pesar de regular el mismo proceso, lo hacen por distintas vías, como hemos visto en apartados anteriores. Las correlaciones más altas, con un valor superior a 0,75, las encontramos entre *CXCL12* y *ZEB2*, *CDH11* y *SPARC* y entre *CXCL12* y *SPARC*. De esta última es de la que hay más información disponible en la literatura.

*CXCL1* es una quimioquina proinflamatoria, también denominada factor derivado del estroma (SDF1), y *SPARC* (osteonectina) es una glicoproteína que pertenece a la familia de las proteínas matricelulares, y como tal, modula las interacciones de la MEC, además de contribuir a su estructura y composición (280). El tejido óseo presenta elevados niveles de *SPARC*, y también está presente en tejidos que requieren remodelación como la cicatrización de heridas, la angiogénesis y la tumorigénesis (281, 282). Ambas proteínas son mediadoras del proceso inflamatorio y se han localizado en el ámbito tumoral donde podrían promover la progresión tumoral. Se ha visto que los liposarcomas mixoides secretan ambas proteínas (entre otras)

contribuyendo a la formación de un microambiente inflamatorio (283). En adenocarcinoma de páncreas, se ha visto que los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs; *Cancer Associated Fibroblasts*), un componente importante del estroma tumoral, afectan al crecimiento tumoral, la supervivencia, la formación de metástasis y la angiogénesis a través de la secreción de CXCL12 y SPARC (284). Como veremos más adelante, la expresión de SPARC en el estroma tumoral también juega un papel importante en el CO.

### 1.5 Perfiles de supervivencia.

Los dos perfiles de supervivencia identificados en este trabajo tienen valor pronóstico en la serie de pacientes utilizada y son capaces de estratificar a dichas pacientes en dos grupos de riesgo. El modelo de SLP está compuesto por 10 genes, de los cuales 5 son considerados factores de riesgo (*HGF*, *ID4*, *PIK3R1*, *SLC39A6* y *SNAI3*) por tener un HR superior a 1, y los 5 restantes (*CDH11*, *CTNNB1*, *EPAS1*, *SPARC* y *VHL*), al tener un HR inferior a 1, son considerados como factores protectores. El modelo de SG, está compuesto por 6 genes, 3 considerados de riesgo (*HGF*, *MET* y *SNAI3*), y tres protectores (*CTNNB1*, *EPAS1* y *SPARC*). Es importante recalcar que los genes son considerados factores de riesgo o factores protectores al analizarlos de manera conjunta con los otros componentes del perfil y que su efecto individual no tiene por qué ser el mismo que dentro del perfil. Los genes *CTNNB1*, *EPAS1*, *HGF*, *SNAI3* y *SPARC* son comunes a los dos y mantienen el mismo signo de HR, dato indicativo de que contribuyen de la misma manera sobre las variables analizadas. Lo mismo se puede decir de *CTNNB1* y *SLC39A6*, que mantienen la significación estadística mostrada en el análisis univariante, y también el signo del HR. Además, la asociación de *SLC39A6* con la SLP se ha podido validar *in silico*.

La precisión de los perfiles fue evaluada a diferentes tiempos mediante curvas ROC. El perfil de SLP mostró una buena capacidad predictiva a lo largo del tiempo con valores de AUC próximos a 0,8. Es importante destacar que, a los 12 meses, el modelo mantiene el potencial predictivo y, por tanto, la capacidad de estratificar a las pacientes en dos grupos de riesgo. En el caso de la SG, el perfil mantiene de manera significativa su capacidad pronóstica a los 36 meses, y la pierde a los 60 meses. Como se puede ver en la curva KM de este modelo (Figura 8B), las líneas de los grupos de riesgo se aproximan a tiempos largos y, por tanto, el modelo pierde la capacidad pronóstica para la SG a partir de los 3 años. Teniendo en cuenta el reducido tamaño muestral inicial, la falta de significación estadística se puede explicar por el número tan bajo de pacientes (N = 26) que permanecen vivas a los 5 años.

Dentro del modelo de SLP, el gen con más peso es *SLC39A6* con un HR = 2,24 por lo que es considerado un factor de riesgo. La proteína *SLC39A6*, también denominada LIV-1 o

ZIP6, es una proteína transportadora de zinc, presente en la membrana plasmática y en la membrana del retículo endoplásmico, encargada de mantener la homeostasis de zinc en el citoplasma (285). El zinc es un cofactor enzimático implicado en múltiples procesos del metabolismo celular, control transcripcional, crecimiento, desarrollo y diferenciación (286). SLC39A6 está implicada en la activación de la TEM ya que se encuentra en la vía de activación del proceso entre dos de los principales inductores, STAT3 y Snail (287, 288). Además, hay estudios que demuestran como SLC39A6 regula los procesos de invasión y metástasis en cáncer de mama, próstata, páncreas, hígado y carcinoma escamoso de esófago (287, 289-292). En cáncer de esófago incluso se ha propuesto como un posible biomarcador para detectar pacientes de alto riesgo (293). Hasta la fecha, en cáncer de ovario hay un único estudio con relación a esta proteína, donde su presencia está relacionada con resistencia al antibiótico tricostatina A (294). Sin embargo, en cáncer de mama, los resultados en cuanto a la expresión de SLC39A6 son contradictorios ya que se ha asociado también con buen pronóstico, y forma parte de perfiles de expresión génica donde se relaciona con una reducida mortalidad y menor recurrencia (295, 296). Recientemente se ha descrito un agente terapéutico que conjuga un anticuerpo anti SLC39A6 con un fármaco citotóxico que podría evaluarse en clínica para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico (297). Analizando los resultados obtenidos en este trabajo podríamos decir que en CO de ovario la expresión de SLC39A6 es un factor de riesgo, indicado por los valores de HR superiores a 1 obtenidos en los análisis estadísticos, que se asocia con una menor supervivencia. Además, los estudios realizados a nivel de proteína en líneas celulares relacionan la expresión de SLC39A6 con un aumento en las recidivas y con la resistencia a CDDP. Por tanto, SLC39A6 podría tener implicación pronóstica en CO ya que su expresión génica está relacionada con la SLP. Aunque se necesita de un estudio en profundidad para corroborar estos resultados, SLC39A6 podría convertirse en una diana terapéutica para la segunda línea de tratamiento de cáncer de ovario, cuando las pacientes han experimentado una recidiva, utilizando nuevos fármacos como el anticuerpo monoclonal mencionado anteriormente en cáncer de mama. Por este motivo, si bien no hemos podido confirmar la capacidad pronóstica de este marcador a nivel proteico en la serie de carcinoma de ovario analizada, sería interesante avanzar en el estudio en tejido tumoral, estudiando la expresión génica en tumores primarios y sus respectivas recaídas antes de poder iniciar estudios *in vivo* o en pacientes, dentro de un ensayo clínico.

En el perfil de SG el gen con mayor impacto es *EPAS1*, y lo consideramos un factor protector (HR = 0,61) en el conjunto de los genes que conforman el modelo. *EPAS1* codifica para la proteína HIF-2 $\alpha$ . Los factores de transcripción de la familia HIF son los encargados de mediar una respuesta adaptativa en las células en condiciones de hipoxia. En condiciones de

normoxia estos factores son hidroxilados y degradados por la vía del proteasoma, pero en condiciones de hipoxia o pseudohipoxia se estabilizan y translocan al núcleo donde se unen a sus genes diana, activando su transcripción (298). Estos genes diana incluyen genes implicados en TEM, además de procesos de desarrollo del cáncer como angiogénesis, progresión y metástasis (299, 300), resultados que están en concordancia con el obtenido en este estudio, donde la expresión proteica de HIF-2 $\alpha$  es un factor de mal pronóstico para la SG de las pacientes (HR = 2,42). Además, en este trabajo hemos podido ver un aumento en la expresión nuclear de HIF-2 $\alpha$  en 11 de las 16 líneas celulares al cultivarlas en 3D con respecto al cultivo en monocapa. Esto puede ser debido a la generación de hipoxia en el modelo en 3D, independientemente de que las células formen agregados o esferas en distinto grado de compactación, y ya ha sido descrito en otros modelos, como en agregados multicelulares en linfoma, el aumento de marcadores de hipoxia (301). En cuanto a su valor pronóstico, la sobreexpresión de HIF-2 $\alpha$  se ha relacionado con mal pronóstico en tumores renales, tumores de pulmón y neuroblastomas (302-304). Estudios *in vitro* en cáncer de ovario han demostrado que el silenciamiento de *EPAS1* produce un aumento en la respuesta al tratamiento con CDDP y paclitaxel y reduce la capacidad proliferativa de las células (305). En nuestra serie, la expresión de la proteína HIF-2 $\alpha$  en el núcleo, también se relaciona de forma significativa con la SG de las pacientes.

#### 1.5.1 Genes comunes a ambos perfiles.

En los dos perfiles de supervivencia hay 5 genes comunes: *CTNNB1*, *HGF*, *SNAI3*, *SPARC* y *EPAS1*.

*CTNNB1* codifica para BCAT, y está involucrado en TEM a través de la vía de Wnt. En cuanto a la implicación de BCAT en cáncer de ovario, existen resultados contradictorios entre grupos, que son un reflejo de los distintos mecanismos de regulación existentes en esta vía y en su implicación con el desarrollo del cáncer. Hay varios trabajos en los que la expresión de BCAT está asociada con buen pronóstico y un aumento en la supervivencia (37, 306, 307), y otros tantos que la relacionan con mal pronóstico, aumento de la invasividad y resistencia al tratamiento con CDDP (308-310). La mayoría de los trabajos mencionados estudian la expresión nuclear de BCAT, no obstante, hay otros grupos que han estudiado, al igual que nosotros, la presencia de BCAT en la membrana. En estos casos, también se han obtenido distintos resultados que relacionan la expresión de BCAT en membrana con una menor SLP, SG y una menor respuesta al tratamiento en primera línea en HGSOC (311), y casos en los que la BCAT conservada en la membrana se relaciona con mayor SLP y SG a 10 años, y los niveles reducidos se relacionan con estadios avanzados de la enfermedad (312).

HGF es un factor de crecimiento secretado por células mesenquimales y único ligando natural del RTK MET. Por tanto, es lógico, que ambos genes tengan el mismo signo en los perfiles. En tejido ovárico normal, HGF se expresa en las células del estroma, aunque en tejido tumoral, tal y como muestran nuestros resultados, y en concordancia con otros autores, observamos también tinción en las células tumorales (313). Tras la unión de HGF a su ligando se activan múltiples vías de señalización implicadas, principalmente, en proliferación celular, motilidad y morfogénesis (314). Se han observado niveles elevados de HGF, tanto en tumor como en plasma, en muchos tipos de cáncer como pulmón, mama, estómago, colon, próstata, cabeza y cuello, hígado y vejiga. Además, muchos de estos estudios han señalado tanto a MET como a HGF como factores de mal pronóstico dada su asociación con un mayor potencial de invasividad y mayor presencia de metástasis (315). En cáncer de ovario también se han detectado niveles elevados de MET en los distintos subtipos histológicos, así como de HGF en el suero y ascitis de pacientes con enfermedad avanzada, que parecen indicativos de un peor pronóstico (316, 317). Dada la elevada prevalencia de activación de esta vía en distintos tipos de tumores, se están desarrollando varios fármacos dirigidos contra dianas de la vía como STAT3, además de HGF y MET (318). En CO, un ensayo fase II con el anticuerpo monoclonal contra HGF, rilotumumab, mostró buena tolerancia, pero una actividad limitada en cuanto a SLP y SG, por lo que no prosiguió la investigación (319).

*SNAI3* codifica para la proteína SNAIL3 que pertenece a la familia de factores de transcripción SNAIL (Snail y Slug). Este gen fue identificado *in silico* en el año 2003 y su ARNm se detectó en muestras de melanoma, carcinoma epidermoide de pulmón y tumores de células germinales (320). Recientemente se ha identificado a *SNAI3* como un posible biomarcador relacionado con invasión en melanoma primario, donde su expresión es elevada en melanomas más gruesos con mayor riesgo de formar metástasis (321). OvMark, una plataforma para la identificación de biomarcadores pronósticos en cáncer de ovario, identificó a *SNAI3* como indicador de buen pronóstico para SG (266). Actualmente, la literatura disponible para este gen es escasa, y la mayoría de trabajos se centran en estudios de desarrollo.

La presencia de SPARC, además de estar implicada en los procesos de adhesión celular (presenta propiedades antiadhesivas), invasión, migración, supervivencia y apoptosis ha sido ampliamente estudiada, y su papel en el cáncer parece ser específico de tejido (322). Se han encontrado niveles elevados de SPARC en tumores de mama, melanoma y glioblastoma, en los que se asocia con un aumento en la invasividad y metástasis, y otros tipos de tumor donde parece jugar un papel supresor, como ovario, colon y páncreas (323). Como se ha mencionado anteriormente, resulta interesante el papel que SPARC pueda desarrollar en el microambiente

tumoral y, en nuestra serie de pacientes, más del 85% mostraron tinción positiva de SPARC en el estroma. Este patrón de expresión ha sido muy estudiado en tumores de páncreas, donde es un factor de mal pronóstico, en cáncer gástrico y en cáncer de pulmón no microcítico (324-327). En cáncer de ovario, los resultados son contradictorios ya que la presencia en el estroma de SPARC está relacionada tanto con un fenotipo maligno donde sugiere un mayor potencial invasivo y una mayor probabilidad de formación de metástasis (328, 329) como con el efecto opuesto, donde SPARC inhibe el crecimiento tumoral e induce la apoptosis, y la ausencia de SPARC acelera la formación de ascitis y de metástasis peritoneal (330-333). Nuestros resultados concuerdan con estos últimos, ya que los estudios de supervivencia realizados en base a la expresión proteica de SPARC en el estroma tumoral muestran que es un factor protector, tanto para SLP como para SG, con unos HR en torno a 0,3. Además, la expresión de este marcador es capaz de estratificar a las pacientes en dos grupos de riesgo (Figura 19). También hay estudios que han relacionado la expresión de SPARC con fenómenos de resistencia a CDDP (330, 334).

## 1.6 Estudio inmunohistoquímico en tejido tumoral.

Al analizar los niveles de expresión proteica de los genes incluidos en los perfiles de supervivencia y de los principales marcadores de TEM por IHQ, identificamos algunos marcadores relacionados de manera independiente con las variables clínico-patológicas estudiadas.

En cuanto a la asociación con la supervivencia, ya se ha comentado anteriormente la relación entre la expresión nuclear de HIF-2 $\alpha$  con la SG y la asociación entre la presencia de SPARC en el estroma tumoral, tanto con la SLP como con la SG. Además de estos marcadores, hemos encontrado también una asociación independiente de la expresión en citoplasma del factor de transcripción Snail con la SLP y la SG, donde su expresión es considerada un factor de riesgo en ambos casos con valores de HR 1,77 y 2,36, respectivamente. Snail y Slug son inhibidores de la ECAD, y hemos encontrado altos niveles de expresión de ambos, tanto citoplasmática como nuclear, y un bajo porcentaje de ECAD conservada en la membrana de las células tumorales (16,7%). Estos resultados concuerdan con los de otros autores, donde una elevada expresión de Snail, junto con una reducción de ECAD, está asociada con un fenotipo de TEM relacionado con un aumento en la diseminación peritoneal y la formación de metástasis y mayor riesgo de muerte (335-337). La expresión nuclear de Snail no ha mostrado relación con ninguna variable en nuestro estudio, no obstante, otros autores han observado un aumento en

la expresión nuclear a medida que avanza la progresión tumoral, y se ha asociado con estadios avanzados de la enfermedad y una menor supervivencia (338, 339).

En los estudios con otras variables clínico-patológicas, la inmunorreactividad de ID4 ha mostrado una asociación con el subtipo histológico seroso de alto grado, donde es un factor de riesgo (OR = 4,23). Este resultado se puede explicar analizando los datos del TCGA, donde se muestra que la región cromosómica que contiene a *ID4* está amplificada en el 32% de los HGSOE (27). Además, Ren y colaboradores demostraron que *ID4* está sobreexpresado en la mayoría de los HGSOE, y en líneas celulares de CO (también en otros tipos de cáncer como endometrio, mama y glioblastoma), donde aumenta la tasa de formación de tumores *in vivo*, y, por tanto, es considerado un oncogén (340). En este mismo trabajo identifican que *ID4* puede contribuir al proceso de transformación tumoral modificando los programas transcripcionales de p21 y HOXA9, implicados en la diferenciación y proliferación en cáncer de ovario.

Como se ha venido comentando, el microambiente tumoral, y, por tanto, de las células del estroma adyacente al tumor, parece jugar un papel muy relevante en la progresión del cáncer. En este trabajo hemos encontrado que la presencia de Zeb1 y SPARC en el estroma está directamente relacionada con la presencia de ascitis peritoneal. La expresión nuclear de los factores ZEB, como han sugerido otros autores, podría estar relacionado con un fenotipo más agresivo en CO (341). Al igual que en otros estudios de cáncer de endometrio, colon, pulmón, vejiga y esófago (342-345), donde se ha descrito la presencia de Zeb1 en el estroma tumoral, en este estudio hemos encontrado un elevado porcentaje (48%) de células con este patrón de expresión, que se asocia con la presencia de ascitis y tiene un efecto protector (OR = 0,23). Otros autores han relacionado la presencia de Zeb1 con un mayor volumen de fluido ascítico, pero en este caso la tinción se localizaba en el tejido tumoral y no en el estroma, por lo que los resultados no se pueden comparar directamente (346). Por el contrario, la presencia de SPARC en el estroma tumoral, se postula como un posible factor de riesgo (OR = 2,5). Estos resultados son contrarios a los mencionados anteriormente, descritos por Said y Motamed, en los que SPARC parece jugar un papel importante en la prevención del desarrollo de carcinomatosis peritoneal gracias a su actividad anti adhesiva a los componentes de la MEC y a su contribución en la formación de un mesotelio más definido (331).

El estudio de las cadherinas E y N nos permitió clasificar los tumores en tres fenotipos, epitelial, intermedio y mesenquimal. En el epitelio ovárico normal (mesotelio), las uniones intercelulares son por NCAD, y la coexpresión con ECAD es condicional e indicativa de una diferenciación epitelial aberrante (metaplasias y neoplasias) (347). Además, el mesotelio ovárico, a diferencia de otros, tiene características epiteliales y mesenquimales que le permiten modificar su estado a través de la TEM y la TME a lo largo del ciclo en respuesta a



estímulos, como, por ejemplo, la ovulación, tras la cual se inicia un proceso regenerativo tras la ruptura provocada por la salida del óvulo, donde las células del epitelio asumen características fenotípicas de células del estroma (348). El 62% de los tumores de nuestra serie mostraron, según la clasificación realizada, un fenotipo intermedio que podríamos explicar dado que la TEM es un proceso dinámico y reversible que está en continua evolución. Hay autores que hablan de un fenotipo “metaestable” en el que las células expresan de manera simultánea marcadores epiteliales y mesenquimales. Esta plasticidad celular sería también una de las posibles explicaciones a la dificultad de observar la EMT *in vivo* en el desarrollo del cáncer ya que la expresión de marcadores mesenquimales sería un proceso transitorio (128, 349).

### 1.7 Otros estudios de perfiles y TEM

La mayoría de estudios de expresión génica en la última década se han realizado mediante *microarrays*, y han permitido la identificación de múltiples perfiles moleculares tanto de supervivencia como de respuesta a quimioterapia en CO (102, 271, 334, 350, 351). Las tarjetas TLDA, aunque menos utilizadas, también han dado lugar a la generación de varios perfiles, incluido uno de nuestro grupo (245, 352, 353).

Lloyd y colaboradores han hecho un estudio comparativo que incluye 42 trabajos de perfiles de expresión génica y proteica, desde el año 2000 hasta el 2014, que analizan la resistencia a quimioterapia y predicen supervivencia en pacientes con CO (84). Muchos de estos estudios presentan variaciones en cuanto a metodología y diseño (*microarrays*, TLDA, IHQ), pero su principal limitación es la heterogeneidad en cuanto al tratamiento recibido por las pacientes dentro de un mismo estudio. Es importante, especialmente a la hora de realizar estudios de respuesta al tratamiento y de desarrollo de resistencias, que las pacientes hayan recibido el mismo tratamiento ya que en caso contrario, los perfiles identificados no van a ser representativos del tratamiento, sino más bien de las vías moleculares implicadas en el desarrollo de resistencias. Hay muy pocas coincidencias entre los genes identificados en estos perfiles, no obstante, la mayoría de ellos coinciden en las vías de señalización y los mecanismos implicados, principalmente proliferación, apoptosis, angiogénesis, motilidad y formación de metástasis. Estos resultados podrían indicar que son los mecanismos, y no genes individuales, quienes requieren más atención a la hora de plantear nuevos experimentos.

Uno de los procesos más relevantes en el desarrollo tumoral es la angiogénesis, descrito como uno de los rasgos distintivos del cáncer por Hanahan y Weinberg (354), y ampliamente estudiado por nuestro grupo en tanto en cáncer de mama como en cáncer de ovario (245, 355, 356). La angiogénesis es uno de los procesos que más atención ha recibido

por parte de la comunidad científica, y como ya se mencionó previamente, se han conseguido desarrollar con éxito terapias dirigidas que actualmente se aplican en la clínica de distintos tipos tumorales (357). En los últimos años se está descubriendo la importancia que juega el microambiente tumoral en el desarrollo de tumores y las interacciones que puedan tener las células tumorales con el estroma tumoral, células madre del cáncer y, especialmente, con células inflamatorias y células del sistema inmunitario. En cáncer de ovario se ha visto que los tumores con abundantes infiltrados linfocitarios tienen un mejor pronóstico (358, 359), pero la evasión del sistema inmunitario y la secreción de factores inmunosupresores por parte de las células cancerígenas podrían bloquear el efecto antitumoral de los linfocitos T citotóxicos y las células NK (*natural killer*). La evasión del sistema inmune por parte de los tumores ha emergido como uno de los nuevos procesos claves del cáncer, y la búsqueda de fármacos que consigan impedir este proceso es el futuro de las terapias dirigidas (215, 360).

La agrupación por subtipos histológicos ha dado lugar a la identificación de distintos tipos moleculares dentro de un mismo subtipo histológico, principalmente en HGSOE. En el año 2004, Spentzos y colaboradores ya habían descrito un perfil en el que niveles elevados de marcadores mesenquimales y componentes del estroma se asociaban con un peor pronóstico (271). Actualmente, los principales estudios de referencia son el de Tothill y colaboradores y el realizado por el consorcio del TCGA (27, 36). Ambos trabajos han identificado 4 subtipos moleculares dentro de los HGSOE, dos de los cuales, representados por una firma de genes del estroma reactivo y por tumores que muestran fenotipo mesenquimal o poco diferenciado, que sugieren la activación de la TEM, son los fenotipos que presentan un peor pronóstico y una menor SG. Los datos generados por el TCGA han servido como base para múltiples estudios, y han dado lugar a la generación de perfiles de supervivencia (361), de respuesta a tratamiento (362) e identificación de biomarcadores en CO (363). El TCGA también ha servido de base para la generación del sistema de clasificación de cáncer de ovario CLOVAR, que ha identificado también perfiles de expresión génica que identifican subtipos (los mismos que el TCGA y Tothill y colaboradores) y supervivencia (105). Recientemente, un grupo japonés ha descrito un nuevo sistema de clasificación histopatológica para HGSOE que también identifica 4 subgrupos moleculares que se correlacionan con los descritos anteriormente (364).

En todos estos trabajos queda patente la importancia del componente estromal en el cáncer de ovario, y esto refuerza la presencia de SPARC en nuestros perfiles de supervivencia. También justifica la búsqueda de perfiles relacionados con el proceso de TEM, que aparece en todos los perfiles como un indicador de mal pronóstico. En esta línea, otros grupos ya han trabajado identificando perfiles de TEM en distintos tipos de cáncer como mama, cabeza y cuello y colon (365-367). En un trabajo, similar en metodología al nuestro, Marín-Aguilera y

colaboradores han identificado un perfil de 63 genes que se sobreexpresan en tumores de páncreas que han recibido quimioterapia neoadyuvante con docetaxel, en comparación con tumores no tratados, y se relacionan con un menor tiempo de progresión radiológica (368). En cáncer de pulmón metastásico también se ha identificado un perfil de 76 genes, donde las células con fenotipo mesenquimal muestran una mayor resistencia a inhibidores de EGFR (erlotinib y gefitinib) y a inhibidores de la vía PI3K/AKT que las células epiteliales, pero no a fármacos citotóxicos como paclitaxel y combinados de platino (369). Este mismo grupo, ha identificado recientemente un perfil utilizando datos del TCGA de pacientes con 11 tipos de cáncer diferentes, que es capaz de evaluar alteraciones moleculares globales relacionadas con la TEM, además de identificar 20 potenciales dianas terapéuticas (106). Un estudio de comparación de melanoma metastásico frente a no metastásico, relaciona el perfil de TEM con los tumores metastásicos. En este perfil, aparece de nuevo SPARC, y mediante IHQ lo localizan en melanocitos tumorales y en vasos cercanos al tumor, lo que relacionan con un fenotipo invasivo más agresivo (370). En cáncer de ovario, se han identificado también varios perfiles relacionados con la TEM (371, 372). Uno de los más relevantes, llevado a cabo por Davidowitz y colaboradores, relaciona la expresión de genes de TEM con la capacidad de algunas células de abrirse paso a través del mesotelio, y esto es muy relevante en la progresión del cáncer de ovario, ya que los órganos de la cavidad peritoneal están recubiertos de una capa de células mesoteliales que las células del tumor tienen que atravesar para poder formar las metástasis (373).

## 2. CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE UN PANEL DE LÍNEAS CELULARES DE CO.

Bajo el término de carcinoma de ovario se agrupan distintas enfermedades que comparten localización en el ovario y la cavidad peritoneal, pero difieren en la respuesta al tratamiento y el pronóstico. Esta heterogeneidad está igualmente representada en las líneas celulares disponibles, y por este motivo es muy importante una caracterización exhaustiva de las mismas, para poder elegir correctamente el modelo *in vitro* más apropiado según los objetivos de cada estudio.

### 2.1 Cultivo en 3D.

En este trabajo se han empleado modelos en dos y tres dimensiones para el estudio morfológico y molecular de los cambios relacionados con el proceso de TEM en 16 líneas de

cáncer de ovario. La mayoría de los datos publicados por la comunidad científica en relación a respuesta terapéutica y fenómenos de resistencia se han obtenido utilizando modelos en dos dimensiones, bien cultivo primario o más comúnmente, células inmortalizadas. Como ya se ha expuesto previamente, los cultivos *in vitro* tienen importantes limitaciones, como la ausencia de estructura tridimensional que presenta un tumor creciendo *in vivo*. Estas limitaciones pueden solventarse con el cultivo en 3D.

Existen varios métodos para realizar cultivo en 3D (374), pero el aplicado en este trabajo presenta, además, la ventaja adicional de un sistema altamente reproducible, en el que una gran cantidad de réplicas pueden ser analizadas a la vez, lo que permite el diseño de estudios sobre crecimiento, migración e invasión y analizar el efecto que los fármacos puedan tener sobre estos procesos (201). Si se suman, por un lado, la mayor fidelidad en cuanto a la reproducción de las características arquitecturales del tumor, y, en base al método utilizado, la alta reproducibilidad, estos cultivos son idóneos para el estudio del cáncer. Un inconveniente importante era la carencia de métodos de análisis cuantitativo, limitando su implementación para el estudio rutinario de respuesta a fármacos. Recientemente se han publicado algunos métodos, y se han desarrollado plataformas, como Celígo S, que complementan a la perfección esta tecnología para estudios farmacodinámicos, ofreciendo tecnologías para la adquisición de la gran cantidad de información que pueden generar estos ensayos, de forma rápida y eficiente, para el *screening* farmacológico.

Adicionalmente, en el caso del cáncer de ovario hay que tener en cuenta su particular proceso de diseminación, ya que las células pueden moverse libremente por la cavidad peritoneal, como células aisladas o agrupaciones de las mismas. Estos esferoides pueden adherirse a las células mesoteliales e invadir la cavidad para formar lesiones secundarias (375). Mimetizando este sistema de adhesión, migración e invasión *in vitro*, y creando un microambiente fisiológico más relevante, se puede mejorar la concordancia entre las predicciones hechas en el laboratorio y la situación clínica. Por tanto, la creación de modelos en 3D es un modelo fisiológico a tener en cuenta en la investigación en cáncer de ovario. Es más, algunos autores proponen la utilización de células tumorales aisladas de ascitis de pacientes para estudios de farmacogenómica (376).

En cuanto a las características basales de estos cultivos y su comparación en 2D hay que tener en cuenta que el método empleado puede producir variabilidad en las esferas obtenidas o sus características. Algunos autores describen que la línea A2780, una de las más utilizadas tradicionalmente en cáncer de ovario, forma esferas de borde definido mediante un método adaptado de gota colgante (377), mientras que en nuestro protocolo forma únicamente agregados celulares. Así, hemos realizado un estudio de caracterización del panel

de líneas seleccionadas, y hemos encontrado que el perfil más común es el de líneas que simplemente forman agregados celulares, si bien también hemos encontrado otras líneas que hacen una esfera de compactación muy laxa, y otras esferas muy compactas. La utilización de estos modelos en estudios posteriores tendrá que tenerse en cuenta y dependerá de si se quiere reflejar más la situación existente en la cavidad peritoneal, o en un tumor sólido.

El número de células de partida y el tamaño del esferoide son parámetros clave en el diseño de estos experimentos, puesto que pueden alterar los resultados de forma sustancial, por ejemplo, en lo que a respuesta a fármacos se refiere. Se ha descrito que la difusión de oxígeno y nutrientes en el tejido tumoral se produce hasta una profundidad de 100  $\mu\text{m}$  (378). Adicionalmente, la presencia de zonas necróticas excesivamente grandes, también puede distorsionar los resultados. Por tanto, es necesario encontrar un equilibrio entre estos factores. En este estudio se ha determinado que, a los cuatro días de crecimiento, el tamaño no debe sobrepasar 400  $\mu\text{m}$  en diámetro, ni 700  $\mu\text{m}$  a tiempo final, para encontrar el balance óptimo entre estas premisas. Con todo ello se ha determinado el número de células de partida, parámetro que debe ser puesto a punto minuciosamente con cada línea celular antes de empezar cualquier tipo de análisis en modelos de 3D.

## 2.2 Respuesta a CDDP.

En este estudio hemos encontrado también un abanico amplio de respuesta a CDDP en 2D, desde líneas consideradas sensibles ( $\text{IC}_{50}$  1,6  $\mu\text{M}$ ), hasta líneas altamente resistentes ( $\text{IC}_{50}$  20,8  $\mu\text{M}$ ). No encontramos relación entre el tipo de crecimiento en 3D y los grados de resistencia a CDDP. Si bien la tendencia general es que las células en 3D suelen ser más resistentes a las cultivadas en 2D (200), también hay trabajos que describen que no hay diferencias sustanciales (182). Inicialmente nos planteamos la medida del área de la esfera como el método de elección para el cálculo del  $\text{IC}_{50}$ , por lo que realizamos estos estudios en aquellas líneas celulares que formaban una esfera compacta. Posteriormente este método fue descartado, y realizamos medidas de viabilidad por fluorescencia, encontrando dos líneas celulares en las que se produce un aumento entre cuatro y seis veces de los valores del  $\text{IC}_{50}$ , y otras dos en las que se mantenían valores similares. En ningún caso se observó disminución, pero en aquellas líneas que formaban esferas laxas o agregados, se decidió utilizar otro abordaje y medir los valores de  $\text{IC}_{50}$  tras mantener las esferas en cultivo en 3D y resiembra en 2D. En este caso sí observamos que se producía una disminución del valor del  $\text{IC}_{50}$  en algunas de las líneas, hecho que atribuimos a que el cultivo en 3D puede estresarlas y sensibilizarlas. Este hecho no se relaciona con el subtipo o los valores iniciales de resistencia. Un abordaje

interesante podría ser la determinación de marcadores asociados, por ejemplo, a la pluripotencialidad, en estas células cultivadas en 3D y resemebradas en 2D, tras la exposición al CDDP.

### 2.3 Estudio inmunohistoquímico de marcadores de TEM.

Por otro lado, hicimos una caracterización de reguladores del proceso TEM, incluyendo cadherinas, vimentina, y los factores de transcripción Snail, Slug, Zeb1 y Zeb2. En general el cultivo en 3D aumenta la presencia de reguladores del proceso TEM, hecho que ha sido descrito por otros autores para otras líneas celulares (373, 379). Para una caracterización de las células en base al fenotipo, epitelial o mesenquimal, constatamos que la mayoría de las células analizadas presentan un fenotipo intermedio. En cuanto a migración e invasión tridimensional, observamos una línea, SKOV3, con migración individual y otra, 59M, con migración colectiva, como ya ha sido descrito por otros autores (380). Estas líneas serían candidatas a tener en cuenta para la valoración de fármacos y biomarcadores involucrados en migración o invasión. En nuestro caso, la expresión de los marcadores analizados en ambas no presenta diferencias para apoyar lo sugerido por otros autores, que asocian la migración colectiva con un fenotipo más epitelial (381).

La heterogeneidad encontrada en las características de las líneas analizadas no es más que el reflejo de la heterogeneidad en el carcinoma de ovario, una enfermedad altamente compleja. La mayoría de las líneas están establecidas a partir de ascitis tumoral, si bien también encontramos algunas a partir de tumor sólido. Tampoco son homogéneas en cuanto a los tratamientos recibidos previos a su establecimiento; por ejemplo, el grupo PEO1, PEO4, PEO6, clasificados como seroso de alto grado, ha recibido CDDP, 5-FU y clorambucil, un esquema no habitual a día de hoy, mientras que PEA 1 y PEA2, CDDP y prednimustina, o PEO16, radioterapia. La expresión de marcadores en estas líneas puede estar condicionada por todas estas variables.

Existen muchos intentos de caracterización exhaustiva de las líneas analizadas y en los últimos años han aparecido algunos trabajos que ponen en entredicho la utilización de algunas de estas líneas como HGSOC en base a su caracterización genética, como es el caso de A2780 y SKOV3 (185), y también líneas reclasificadas, como PEO14/PEO23, inicialmente descritas por Langdon en 1988 como carcinoma bien diferenciado, y en estudios posteriores, como HGSOC (251, 382).

En cuanto a los pares de resistencia, también hay que tener en cuenta que no es lo mismo la generación *in vitro* de dicha resistencia, como A2780CIS, que líneas con resistencias

fisiológicas, como las líneas provenientes de recidivas tras tratamiento con CDDP de la paciente. Existen algunos estudios que identifican concordancias pobres entre líneas generadas *in vitro* y con resistencia de forma natural (382, 383).

Por todo ello es necesaria una re-caracterización de las líneas disponibles para poder realizar los experimentos y la interpretación de datos correcta. Uno de los primeros estudios que aplicó la tecnología de secuenciación masiva para la caracterización de líneas celulares identificaba más de 2000 transcritos estadísticamente significativos entre la línea IGROV1 y su isogénica resistente a platino (384). Desde entonces han aparecido varios estudios que han permitido una reclasificación de las líneas celulares en base a características genotípicas, y constantemente aparecen nuevas baterías de líneas celulares, caracterizadas en base a estudios recientes (385).

En las líneas celulares analizadas se han caracterizado una batería de reguladores del proceso TEM, y se ha constatado que la mayoría de líneas presentarían fenotipos intermedios. El proceso de TEM confiere plasticidad a las células, y es un proceso dinámico. Hemos visto que es importante para la diseminación y aparición de metástasis, y en el caso del cáncer de ovario, la adquisición transitoria de propiedades mesenquimales a la vez que epiteliales puede ser importante para el establecimiento de siembras peritoneales. En cuanto a los marcadores analizados, sería muy interesante ver los cambios producidos en su expresión en modelos multicelulares, como el propuesto por Kenny y colaboradores, donde describen el co-cultivo de células del mesotelio, fibroblastos y células tumorales (196). La aplicación de la técnica de 3D aquí descrita a estos co-cultivos podría ser todavía más interesante.

Evidencias durante las dos últimas décadas han demostrado la importancia del microambiente tumoral en la progresión de la enfermedad. Los componentes de este microambiente incluyen a las propias células epiteliales transformadas, fibroblastos asociados al tumor, células pluripotenciales mesenquimales que infiltran el tumor, linfocitos, y células endoteliales. Todos ellos interaccionan con las células tumorales y dicha interacción provoca cambios en las características biológicas del tumor, como su proliferación, migración e invasión, así como la aparición de fenómenos de resistencia (386).

Este trabajo proporciona las bases para la utilización de modelos tridimensionales altamente reproducibles en la investigación de biomarcadores en cáncer de ovario. Adicionalmente, describe nuevas herramientas moleculares relacionadas con el proceso de TEM con potencial utilidad en el pronóstico clínico de las pacientes.

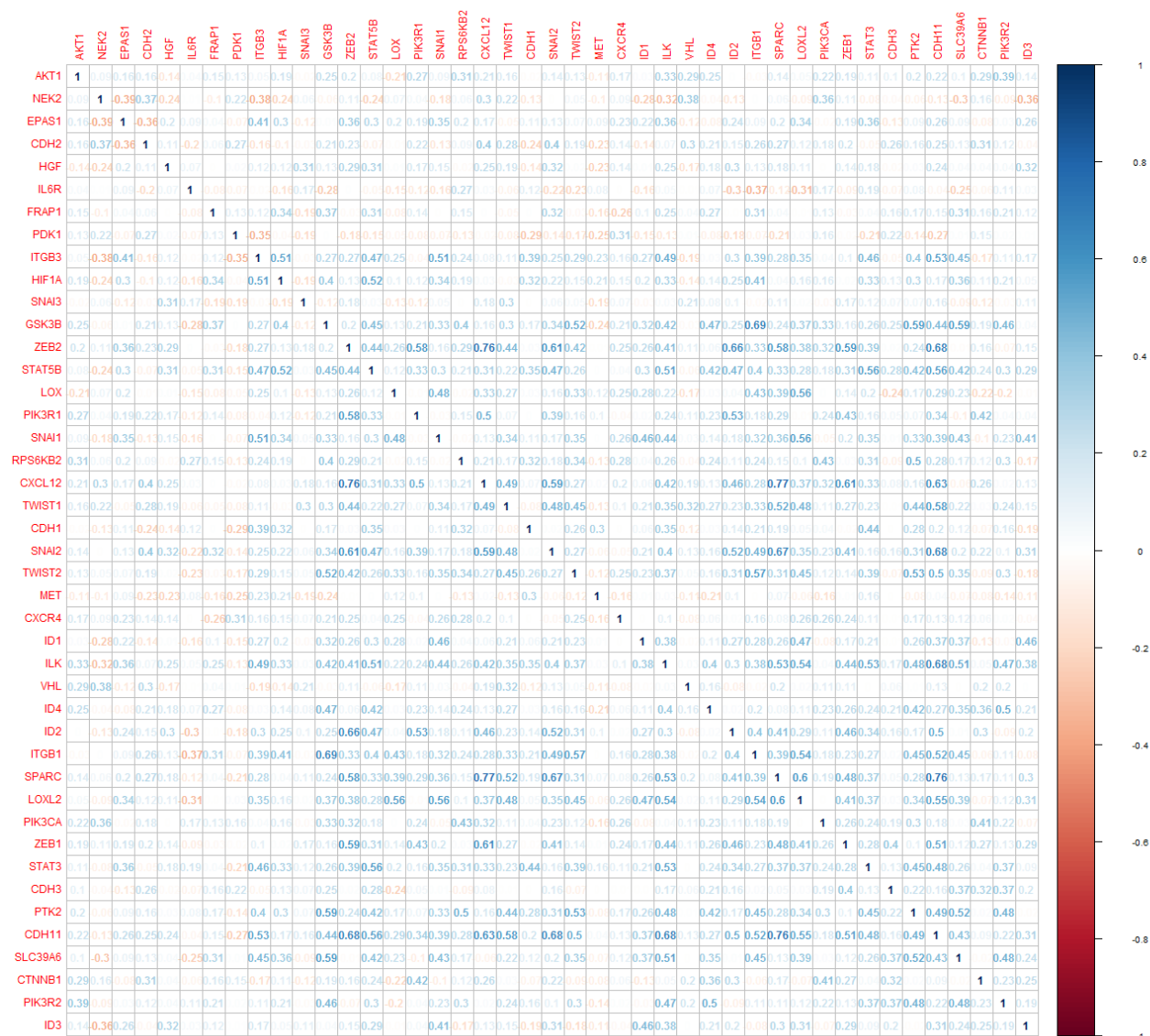
## VI. CONCLUSIONES



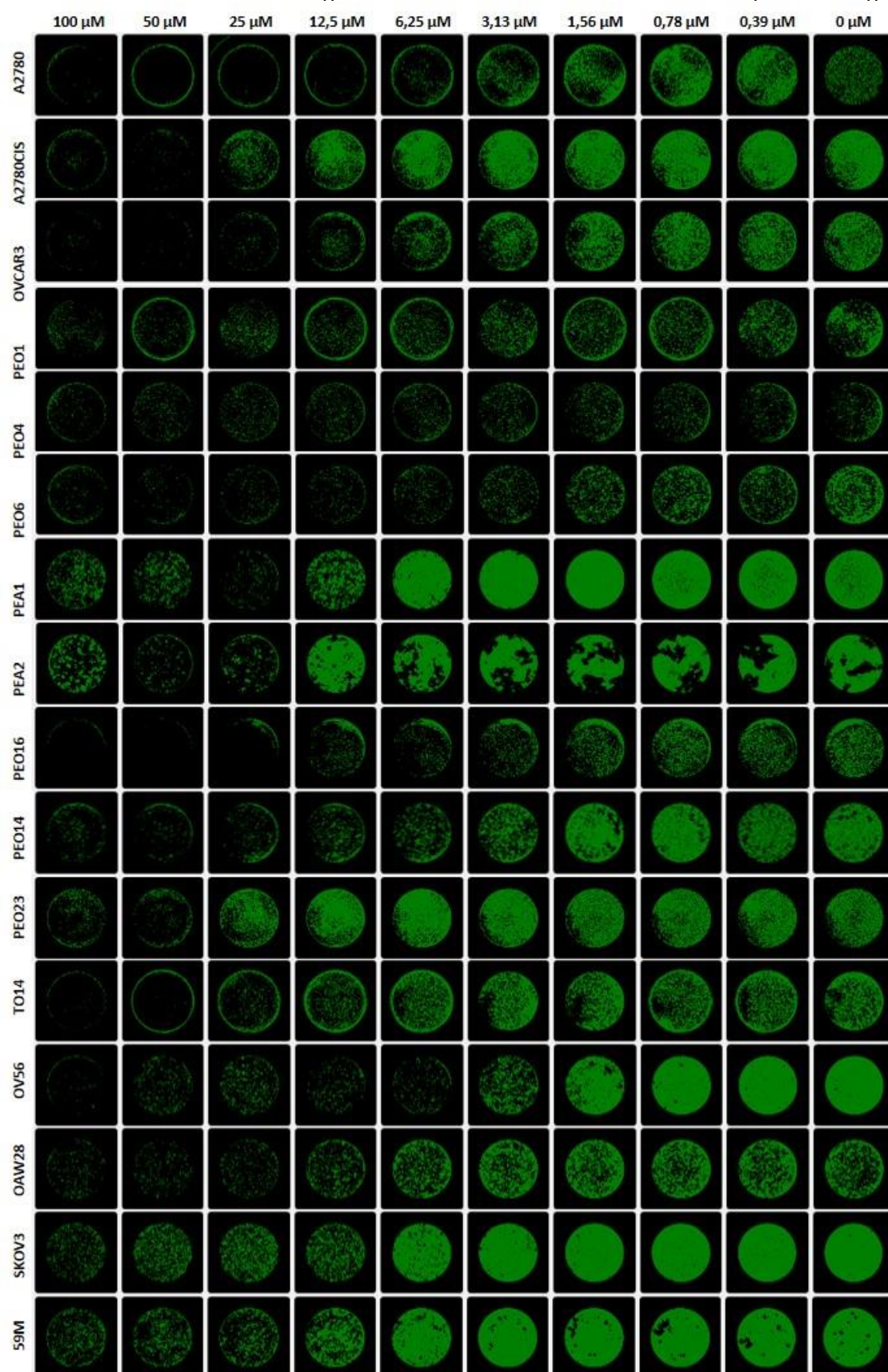
1. Se han identificado dos perfiles de expresión génica con capacidad pronóstica relacionados con la TEM en carcinoma de ovario. El perfil de SLP consta de 10 genes, siendo *SLC39A6* el de mayor influencia, mientras que el perfil de SG se compone de 6 genes de los cuales *EPAS1* es el que tiene un mayor peso.
2. Los estudios de inmunohistoquímica sugieren tres posibles biomarcadores pronósticos en carcinoma de ovario: HIF-2 $\alpha$ , Snail y SPARC.
3. Se han caracterizado modelos en dos y tres dimensiones a partir de un panel de líneas celulares de cáncer de ovario. Este análisis ha constatado la heterogeneidad de estas líneas celulares y la importancia que tiene una selección adecuada de los modelos preclínicos para el estudio de esta enfermedad.
4. El estudio de *SLC39A6* en líneas celulares indica que este gen podría tener un papel en la resistencia a platino, y estar involucrado en el desarrollo de recidivas en cáncer de ovario.
5. Los cultivos celulares en tres dimensiones, que representan de forma más fehaciente la arquitectura tumoral, constituyen un modelo alternativo para los estudios *in vitro*, especialmente en estudios de sensibilidad a fármacos.

## VII. ANEXO

**Figura 1.** Diagrama de correlación entre las distintas variables génicas. Valores superiores a 0,25 (positivos o negativos) son indicativos de correlación, y valores superiores a 0,75 indicativos de una correlación elevada.

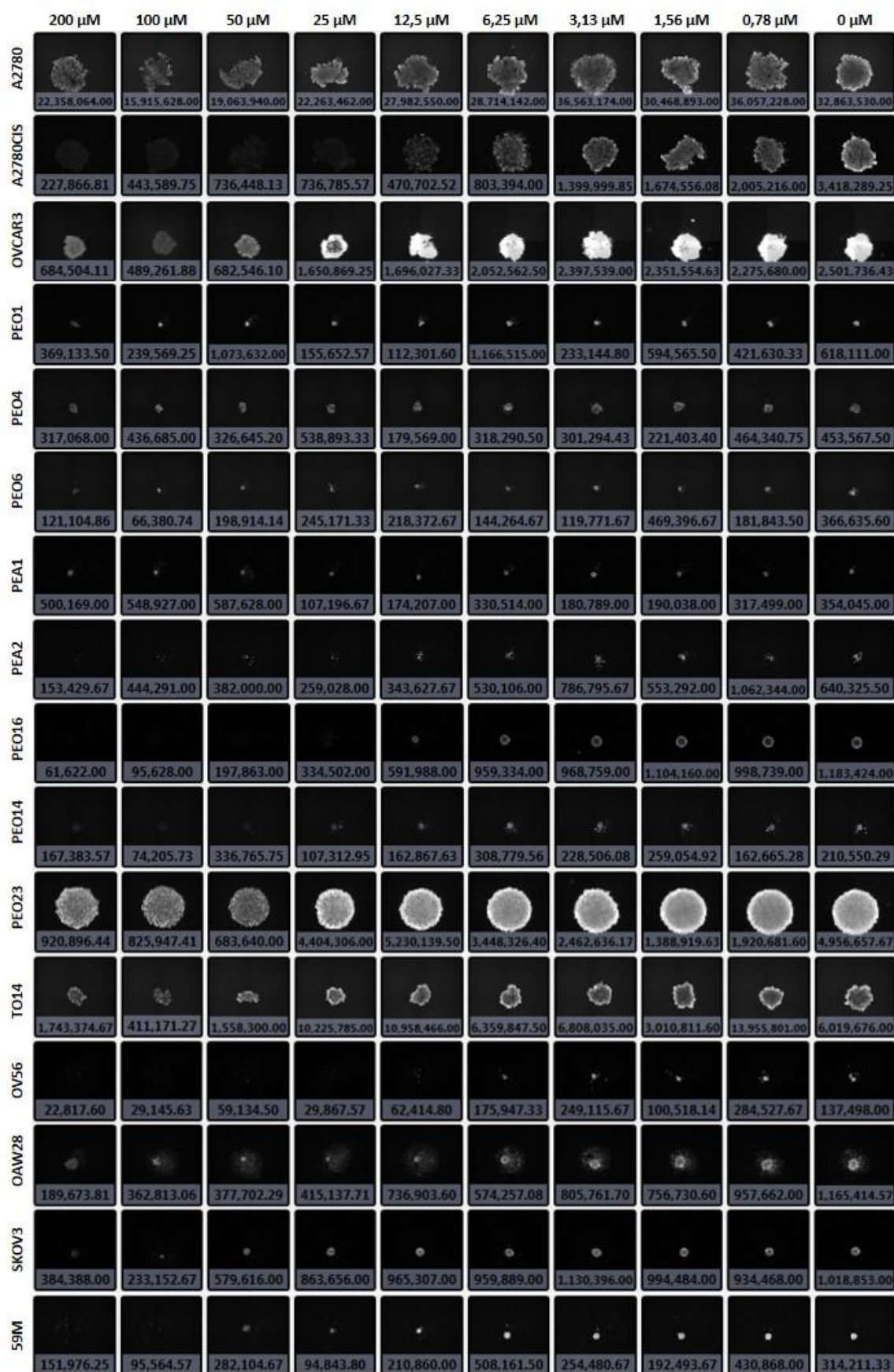


**Figura 2.** Confluencia celular en los experimentos para el cálculo del IC<sub>50</sub> para CDDP en las distintas líneas celulares. Imágenes tomadas con el citómetro de placas CeligoS.





**Figura 3.** IC<sub>50</sub> para CDDP en esferas de las distintas líneas celulares. Esferas teñidas con el marcador de viabilidad calceína AM. Imágenes tomadas con el citómetro de placas CeligoS.



**Tabla 1.** Genes analizados en el estudio de expresión y genes HK (\*).

<b>Símbolo del gen</b>	<b>Nombre del gen/Descripción</b>	<b>Alias alternativo</b>
<i>ACTB*</i>	<i>Actin, Beta</i>	<i>ACTB</i>
<i>AKT1</i>	<i>V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1</i>	<i>AKT</i>
<i>B2M*</i>	<i>Beta-2-Microglobulin</i>	<i>B2M</i>
<i>CDH1</i>	<i>Cadherin 1</i>	<i>ECAD</i>
<i>CDH11</i>	<i>Cadherin 11</i>	<i>CDH11</i>
<i>CDH2</i>	<i>Cadherin 2</i>	<i>NCAD</i>
<i>CDH3</i>	<i>Cadherin 3</i>	<i>PCAD</i>
<i>CTNNB1</i>	<i>Catenin Beta 1</i>	<i>BCAT</i>
<i>CXCL12</i>	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 12</i>	<i>CXCL12</i>
<i>CXCR4</i>	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 4</i>	<i>CXCR4</i>
<i>EPAS1</i>	<i>Endothelial PAS Domain Protein 1</i>	<i>HIF2-<math>\alpha</math></i>
<i>FRAP1</i>	<i>Mechanistic Target Of Rapamycin</i>	<i>MTOR</i>
<i>GAPDH*</i>	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>	<i>GAPDH</i>
<i>GSK3B</i>	<i>Glycogen Synthase Kinase 3 Beta</i>	<i>GSK-3<math>\beta</math></i>
<i>GUSB*</i>	<i>Glucuronidase Beta</i>	<i>GUSB</i>
<i>HGF</i>	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>	<i>HGF</i>
<i>HIF1A</i>	<i>Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit</i>	<i>HIF1-<math>\alpha</math></i>
<i>ID1</i>	<i>Inhibitor of DNA Binding 1, HLH Protein</i>	<i>ID1</i>
<i>ID2</i>	<i>Inhibitor of DNA Binding 2, HLH Protein</i>	<i>ID2</i>
<i>ID3</i>	<i>Inhibitor of DNA Binding 3, HLH Protein</i>	<i>ID3</i>
<i>ID4</i>	<i>Inhibitor of DNA Binding 4, HLH Protein</i>	<i>ID4</i>
<i>IL6R</i>	<i>Interleukin 6 Receptor</i>	<i>IL6R</i>
<i>ILK</i>	<i>Integrin Linked Kinase</i>	<i>ILK</i>
<i>ITGB1</i>	<i>Integrin Subunit Beta 1</i>	<i>ITGB1</i>
<i>ITGB3</i>	<i>Integrin Subunit Beta 3</i>	<i>ITGB3</i>
<i>LOX</i>	<i>Lysyl Oxidase</i>	<i>LOX</i>
<i>LOXL2</i>	<i>Lysyl Oxidase Like 2</i>	<i>LOXL2</i>
<i>MET</i>	<i>MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase</i>	<i>MET</i>
<i>NEK2</i>	<i>NIMA Related Kinase 2</i>	<i>NEK2</i>
<i>PDK1</i>	<i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1</i>	<i>PDK1</i>
<i>PIK3CA</i>	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i>	<i>PIK3CA</i>
<i>PIK3R1</i>	<i>Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1</i>	<i>PIK3R1</i>
<i>PIK3R2</i>	<i>Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 2</i>	<i>PIK3R2</i>
<i>PTK2</i>	<i>Protein Tyrosine Kinase 2</i>	<i>PTK2</i>
<i>RNA18S5*</i>	<i>RNA, 18S Ribosomal 5</i>	<i>18S</i>
<i>RPS6KB2</i>	<i>Ribosomal Protein S6 Kinase B2</i>	<i>RPS6KB2</i>
<i>SLC39A6</i>	<i>Solute Carrier Family 39 Member 6</i>	<i>SLC39A6</i>
<i>SNAI1</i>	<i>Snail Family Zinc Finger 1</i>	<i>SNAIL</i>
<i>SNAI2</i>	<i>Snail Family Zinc Finger 2</i>	<i>SLUG</i>
<i>SNAI3</i>	<i>Snail Family Zinc Finger 3</i>	<i>SNAIL3</i>
<i>SPARC</i>	<i>Secreted Protein Acidic and Cysteine Rich</i>	<i>SPARC</i>
<i>STAT3</i>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>	<i>STAT3</i>
<i>STAT5B</i>	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5B</i>	<i>STAT5B</i>

<i>TWIST1</i>	<i>Twist Family BHLH Transcription Factor 1</i>	<i>TWIST1</i>
<i>TWIST2</i>	<i>Twist Family BHLH Transcription Factor 2</i>	<i>TWIST2</i>
<i>VHL</i>	<i>Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor</i>	<i>VHL</i>
<i>ZEB1</i>	<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1</i>	<i>ZEB1</i>
<i>ZEB2</i>	<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2</i>	<i>ZEB2</i>

**Tabla 2.** Valores de expresión de los 43 genes obtenidos mediante el análisis de expresión de las tarjetas TLDA.

Gen	Media	Mínimo	Máximo	Gen	Media	Mínimo	Máximo
<i>AKT1</i>	1,289	-0,154	3,498	<i>LOXL2</i>	1,819	-0,989	5,081
<i>CDH1</i>	0,031	-2,929	8,206	<i>MET</i>	4,636	0,281	11,333
<i>CDH11</i>	1,645	-1,849	5,533	<i>NEK2</i>	6,161	2,718	10,629
<i>CDH2</i>	3,522	-0,856	10,342	<i>PDK1</i>	3,59	1,117	6,995
<i>CDH3</i>	4,275	0,624	8,911	<i>PIK3CA</i>	4,595	2,813	7,263
<i>CTNNB1</i>	2,294	0,443	5,095	<i>PIK3R1</i>	2,818	0,206	5,466
<i>CXCL12</i>	1,315	-1,918	6,87	<i>PIK3R2</i>	1,017	-0,992	3,833
<i>CXCR4</i>	2,382	-0,094	4,915	<i>PTK2</i>	1,35	-1,327	4,407
<i>EPAS1</i>	2,087	-0,473	3,769	<i>RPS6KB2</i>	2,255	0,831	4,346
<i>FRAP1</i>	2,915	1,459	5,343	<i>SLC39A6</i>	1,934	-0,426	5,372
<i>GSK3B</i>	1,475	-0,508	3,489	<i>SNAI1</i>	5,324	0,234	8,762
<i>HGF</i>	5,849	-0,659	11,612	<i>SNAI2</i>	4,149	0,991	10,342
<i>HIF1A</i>	0,979	-0,563	2,25	<i>SNAI3</i>	7,882	4,224	11,612
<i>ID1</i>	2,217	-1,677	5,876	<i>SPARC</i>	-1,261	-4,171	3,594
<i>ID2</i>	1,618	-1,549	4,081	<i>STAT3</i>	0,098	-3,214	1,493
<i>ID3</i>	3,175	-0,825	7,305	<i>STAT5B</i>	2,972	0,346	5,447
<i>ID4</i>	0,997	-2,985	5,945	<i>TWIST1</i>	3,218	-2,946	8,12
<i>IL6R</i>	3,175	0,361	7,868	<i>TWIST2</i>	10,57	4,636	14,234
<i>ILK</i>	1,164	-0,467	2,957	<i>VHL</i>	7,16	4,007	12,521
<i>ITGB1</i>	-0,108	-2,259	2,225	<i>ZEB1</i>	5,284	2,35	10,508
<i>ITGB3</i>	3,298	-0,617	7,799	<i>ZEB2</i>	3,932	0,897	6,934
<i>LOX</i>	3,07	-0,336	7,41				



**Tabla 3.** Análisis univariante y test FDR para la histología tumoral, HGSOC frente al resto de subtipos histológicos.

Gen	OR	95% L. I.	95% L. S.	p-valor	FDR
<i>AKT1</i>	1,064	0,914	1,240	0,424	FALSO
<i>CDH1</i>	1,071	1,006	1,141	<b>0,035</b>	FALSO
<i>CDH11</i>	1,008	0,937	1,084	0,829	FALSO
<i>CDH2</i>	0,926	0,880	0,974	<b>0,004</b>	FALSO
<i>CDH3</i>	0,917	0,856	0,981	<b>0,014</b>	FALSO
<i>CTNNB1</i>	0,927	0,826	1,039	0,195	FALSO
<i>CXCL12</i>	0,955	0,899	1,015	0,142	FALSO
<i>CXCR4</i>	0,979	0,890	1,077	0,666	FALSO
<i>EPAS1</i>	1,198	1,069	1,343	<b>0,003</b>	FALSO
<i>FRAP1</i>	1,069	0,919	1,243	0,390	FALSO
<i>GSK3B</i>	1,039	0,907	1,192	0,581	FALSO
<i>HGF</i>	0,985	0,935	1,038	0,580	FALSO
<i>HIF1A</i>	1,164	0,963	1,407	0,119	FALSO
<i>ID1</i>	1,023	0,960	1,090	0,484	FALSO
<i>ID2</i>	1,068	0,978	1,165	0,146	FALSO
<i>ID3</i>	0,953	0,892	1,017	0,153	FALSO
<i>ID4</i>	0,940	0,881	1,004	0,067	FALSO
<i>IL6R</i>	0,917	0,851	0,987	<b>0,023</b>	FALSO
<i>ILK</i>	1,057	0,918	1,217	0,442	FALSO
<i>ITGB1</i>	1,065	0,942	1,204	0,318	FALSO
<i>ITGB3</i>	1,066	1,010	1,125	<b>0,022</b>	FALSO
<i>LOX</i>	0,998	0,929	1,073	0,966	FALSO
<i>LOXL2</i>	1,041	0,944	1,149	0,421	FALSO
<i>MET</i>	1,012	0,969	1,058	0,586	FALSO
<i>NEK2</i>	0,949	0,898	1,003	0,069	FALSO
<i>PDK1</i>	0,931	0,843	1,029	0,165	FALSO
<i>PIK3CA</i>	0,874	0,781	0,978	<b>0,021</b>	FALSO
<i>PIK3R1</i>	1,052	0,961	1,152	0,272	FALSO
<i>PIK3R2</i>	0,913	0,806	1,035	0,157	FALSO
<i>PTK2</i>	0,953	0,843	1,077	0,444	FALSO
<i>RPS6KB2</i>	1,015	0,861	1,196	0,863	FALSO
<i>SLC39A6</i>	0,993	0,888	1,111	0,909	FALSO
<i>SNAI1</i>	1,023	0,953	1,099	0,528	FALSO
<i>SNAI2</i>	0,987	0,918	1,060	0,716	FALSO
<i>SNAI3</i>	0,962	0,901	1,027	0,247	FALSO
<i>SPARC</i>	0,984	0,902	1,075	0,729	FALSO
<i>STAT3</i>	1,012	0,879	1,165	0,867	FALSO
<i>STAT5B</i>	1,044	0,933	1,170	0,455	FALSO
<i>TWIST1</i>	0,957	0,903	1,014	0,141	FALSO
<i>TWIST2</i>	1,028	0,968	1,091	0,373	FALSO
<i>VHL</i>	0,962	0,902	1,027	0,253	FALSO
<i>ZEB1</i>	0,980	0,925	1,038	0,496	FALSO
<i>ZEB2</i>	1,002	0,918	1,093	0,963	FALSO

**Tabla 4.** Resultados del análisis univariante, Boosting y Lasso para SLP.

Gen	HR	95% L. I.	95% L. S.	p-valor	Boosting HR	Lasso HR
<i>AKT1</i>	0,795	0,533	1,184	0,253	NA	NA
<i>CDH1</i>	1,080	0,933	1,251	0,321	NA	NA
<i>CDH11</i>	0,949	0,823	1,093	0,465	0,728	0,974
<i>CDH2</i>	0,951	0,843	1,073	0,410	NA	NA
<i>CDH3</i>	1,006	0,866	1,167	0,942	NA	NA
<i>CTNNB1</i>	0,656	0,492	0,874	<b>0,002</b>	0,761	0,817
<i>CXCL12</i>	0,907	0,782	1,053	0,192	NA	NA
<i>CXCR4</i>	1,074	0,863	1,337	0,521	1,028	NA
<i>EPAS1</i>	0,849	0,644	1,120	0,248	0,698	0,889
<i>FRAP1</i>	0,846	0,601	1,191	0,334	0,861	NA
<i>GSK3B</i>	1,090	0,813	1,461	0,567	NA	NA
<i>HGF</i>	1,126	0,977	1,299	0,101	1,759	1,110
<i>HIF1A</i>	1,592	0,988	2,566	0,052	1,196	NA
<i>ID1</i>	1,000	0,874	1,143	0,996	0,966	NA
<i>ID2</i>	0,922	0,762	1,116	0,410	0,790	NA
<i>ID3</i>	0,930	0,799	1,082	0,347	NA	NA
<i>ID4</i>	1,018	0,884	1,171	0,808	1,107	1,001
<i>IL6R</i>	0,984	0,828	1,170	0,857	NA	NA
<i>ILK</i>	1,187	0,862	1,633	0,294	1,150	NA
<i>ITGB1</i>	1,062	0,824	1,369	0,640	NA	NA
<i>ITGB3</i>	1,033	0,916	1,166	0,594	NA	NA
<i>LOX</i>	1,031	0,888	1,198	0,686	NA	NA
<i>LOXL2</i>	0,996	0,800	1,239	0,969	0,973	NA
<i>MET</i>	1,039	0,933	1,157	0,487	NA	1,029
<i>NEK2</i>	0,935	0,822	1,064	0,307	0,869	NA
<i>PDK1</i>	0,970	0,754	1,248	0,814	NA	NA
<i>PIK3CA</i>	0,796	0,618	1,026	0,074	NA	NA
<i>PIK3R1</i>	0,824	0,669	1,015	0,070	0,925	0,942
<i>PIK3R2</i>	1,026	0,767	1,372	0,863	NA	NA
<i>PTK2</i>	1,014	0,766	1,344	0,921	0,871	NA
<i>RPS6KB2</i>	0,999	0,673	1,481	0,995	1,031	NA
<i>SLC39A6</i>	1,368	1,003	1,866	<b>0,044</b>	1,580	1,193
<i>SNAI1</i>	1,071	0,912	1,258	0,400	1,031	NA
<i>SNAI2</i>	0,935	0,805	1,085	0,368	1,074	NA
<i>SNAI3</i>	1,100	0,940	1,288	0,234	1,414	1,054
<i>SPARC</i>	0,842	0,684	1,037	0,091	0,854	0,911
<i>STAT3</i>	1,118	0,810	1,544	0,488	NA	NA
<i>STAT5B</i>	1,074	0,827	1,393	0,592	1,023	NA
<i>TWIST1</i>	1,008	0,898	1,131	0,897	NA	NA
<i>TWIST2</i>	1,038	0,913	1,181	0,562	0,964	NA
<i>VHL</i>	0,897	0,772	1,043	0,150	0,848	0,979
<i>ZEB1</i>	0,933	0,805	1,080	0,343	NA	NA
<i>ZEB2</i>	0,929	0,764	1,129	0,460	1,089	NA

**Tabla 5.** Resultados del análisis univariante, Boosting y Lasso para SG.

Gen	HR	95% L. I.	95% L. S.	p-valor	Boosting HR	Lasso HR
<i>AKT1</i>	0,900	0,587	1,379	0,627	NA	NA
<i>CDH1</i>	0,988	0,822	1,188	0,898	0,887	NA
<i>CDH11</i>	0,968	0,823	1,140	0,699	0,968	NA
<i>CDH2</i>	1,000	0,876	1,141	0,997	NA	NA
<i>CDH3</i>	0,996	0,834	1,189	0,961	0,866	NA
<i>CTNNB1</i>	0,719	0,527	0,981	<b>0,031</b>	0,743	0,892
<i>CXCL12</i>	0,969	0,825	1,139	0,704	NA	NA
<i>CXCR4</i>	1,024	0,801	1,308	0,851	1,037	NA
<i>EPAS1</i>	0,757	0,553	1,035	0,081	0,688	0,933
<i>FRAP1</i>	0,945	0,648	1,376	0,766	0,983	NA
<i>GSK3B</i>	1,025	0,737	1,425	0,884	NA	NA
<i>HGF</i>	1,120	0,959	1,309	0,151	1,613	1,079
<i>HIF1A</i>	1,630	0,956	2,778	0,070	1,281	NA
<i>ID1</i>	0,971	0,833	1,132	0,711	0,959	NA
<i>ID2</i>	0,901	0,729	1,114	0,343	0,860	NA
<i>ID3</i>	0,952	0,800	1,133	0,580	NA	NA
<i>ID4</i>	1,030	0,880	1,205	0,714	1,042	NA
<i>IL6R</i>	1,002	0,822	1,222	0,985	NA	NA
<i>ILK</i>	1,177	0,814	1,701	0,387	1,182	NA
<i>ITGB1</i>	1,081	0,809	1,445	0,599	NA	NA
<i>ITGB3</i>	0,996	0,865	1,148	0,961	NA	NA
<i>LOX</i>	1,046	0,884	1,237	0,598	NA	NA
<i>LOXL2</i>	0,927	0,728	1,180	0,535	0,863	NA
<i>MET</i>	1,066	0,939	1,211	0,328	1,278	1,071
<i>NEK2</i>	0,975	0,845	1,125	0,724	NA	NA
<i>PDK1</i>	0,961	0,731	1,264	0,777	NA	NA
<i>PIK3CA</i>	0,823	0,620	1,092	0,173	NA	NA
<i>PIK3R1</i>	0,906	0,709	1,159	0,434	NA	NA
<i>PIK3R2</i>	1,012	0,743	1,378	0,940	NA	NA
<i>PTK2</i>	0,949	0,694	1,299	0,746	0,764	NA
<i>RPS6KB2</i>	0,877	0,559	1,377	0,566	NA	NA
<i>SLC39A6</i>	1,323	0,949	1,845	0,099	1,439	NA
<i>SNAI1</i>	1,031	0,862	1,234	0,735	NA	NA
<i>SNAI2</i>	0,951	0,803	1,125	0,550	0,938	NA
<i>SNAI3</i>	1,127	0,946	1,343	0,177	1,467	1,043
<i>SPARC</i>	0,891	0,716	1,110	0,291	0,897	0,941
<i>STAT3</i>	1,069	0,756	1,510	0,703	1,017	NA
<i>STAT5B</i>	1,052	0,787	1,406	0,731	NA	NA
<i>TWIST1</i>	1,034	0,907	1,179	0,619	NA	NA
<i>TWIST2</i>	1,039	0,895	1,207	0,611	NA	NA
<i>VHL</i>	0,922	0,782	1,086	0,324	0,919	NA
<i>ZEB1</i>	0,962	0,817	1,134	0,644	1,143	NA
<i>ZEB2</i>	0,963	0,767	1,209	0,747	NA	NA

**Tabla 6.** Análisis univariantes del estudio inmunohistoquímico para SLP y SG. C = citoplasma; E = estroma; N = núcleo, T = tumor.

Proteína	SLP				SG			
	HR	95% L. I.	95% L. S.	p-valor	HR	95% L. I.	95% L. S.	p-valor
BCAT	1,261	0,659	2,413	0,484	1,575	0,801	3,097	0,188
ECAD	0,858	0,435	1,692	0,659	1,379	0,687	2,766	0,366
HGF	0,525	0,264	1,045	0,067	0,517	0,231	1,159	0,109
HIF2A (C)	1,165	0,632	2,140	0,624	1,518	0,725	3,170	0,269
HIF2A (N)	1,722	0,883	3,357	0,110	2,420	1,182	4,957	<b>0,016</b>
ID4	0,926	0,613	1,399	0,715	0,917	0,579	1,453	0,712
MET	0,893	0,660	1,207	0,460	0,855	0,607	1,204	0,369
NCAD	1,308	0,692	2,474	0,409	1,729	0,853	3,505	0,129
SLC39A6 (C)	1,094	0,784	1,526	0,596	1,085	0,742	1,587	0,674
SLC39A6 (N)	0,867	0,583	1,290	0,482	0,795	0,514	1,230	0,303
SLUG	0,610	0,364	1,021	0,060	0,657	0,368	1,174	0,156
SNAI3	1,769	0,755	4,146	0,189	1,438	0,565	3,662	0,446
SNAIL (C)	1,776	1,063	2,969	<b>0,028</b>	2,358	1,327	4,190	<b>0,003</b>
SNAIL (N)	0,610	0,364	1,021	0,060	0,657	0,368	1,174	0,156
SPARC (E)	0,355	0,162	0,779	<b>0,010</b>	0,259	0,106	0,630	<b>0,003</b>
SPARC (T)	1,346	0,571	3,171	0,497	0,970	0,345	2,727	0,954
VIM	1,050	0,584	1,885	0,871	1,021	0,682	1,527	0,920
VHL	0,865	0,602	1,242	0,431	1,033	0,685	1,558	0,877
ZEB1 (E)	1,223	0,741	2,016	0,431	1,348	0,761	2,386	0,306
ZEB1 (T)	0,953	0,517	1,758	0,877	0,999	0,497	2,011	0,999
ZEB2 (E)	0,572	0,239	1,368	0,209	0,658	0,253	1,710	0,391
ZEB2 (T)	0,918	0,470	1,795	0,803	0,983	0,468	2,068	0,964

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2013;132(5):1133-45.
2. Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet] 2012.
3. Hennessy BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer. *Lancet*. 2009;374(9698):1371-82.
4. Cannistra SA. Cancer of the ovary. *The New England journal of medicine*. 2004;351(24):2519-29.
5. Rubin SC, Blackwood MA, Bandera C, Behbakht K, Benjamin I, Rebbeck TR, et al. BRCA1, BRCA2, and hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene mutations in an unselected ovarian cancer population: relationship to family history and implications for genetic testing. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1998;178(4):670-7.
6. Weissman SM, Weiss SM, Newlin AC. Genetic testing by cancer site: ovary. *Cancer journal*. 2012;18(4):320-7.
7. Burges A, Schmalfeldt B. Ovarian cancer: diagnosis and treatment. *Deutsches Arzteblatt international*. 2011;108(38):635-41.
8. Hankinson SE, Hunter DJ, Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Rosner B, et al. Tubal ligation, hysterectomy, and risk of ovarian cancer. A prospective study. *Jama*. 1993;270(23):2813-8.
9. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian C, Beral V, Doll R, Hermon C, Peto R, Reeves G. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet*. 2008;371(9609):303-14.
10. Havrilesky LJ, Moorman PG, Lowery WJ, Gierisch JM, Coeytaux RR, Urrutia RP, et al. Oral contraceptive pills as primary prevention for ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Obstetrics and gynecology*. 2013;122(1):139-47.
11. Kurman RJ. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24 Suppl 10:x16-21.
12. Vaughan S, Coward JI, Bast RC, Jr., Berchuck A, Berek JS, Brenton JD, et al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nature reviews Cancer*. 2011;11(10):719-25.
13. Fathalla MF. Incessant ovulation and ovarian cancer - a hypothesis re-visited. *Facts, views & vision in ObGyn*. 2013;5(4):292-7.
14. Dubeau L. The cell of origin of ovarian epithelial tumours. *The Lancet Oncology*. 2008;9(12):1191-7.
15. Nik NN, Vang R, Shih Ie M, Kurman RJ. Origin and pathogenesis of pelvic (ovarian, tubal, and primary peritoneal) serous carcinoma. *Annual review of pathology*. 2014;9:27-45.
16. Crum CP, Drapkin R, Kindelberger D, Medeiros F, Miron A, Lee Y. Lessons from BRCA: the tubal fimbria emerges as an origin for pelvic serous cancer. *Clinical medicine & research*. 2007;5(1):35-44.
17. Diniz PM, Carvalho JP, Baracat EC, Carvalho FM. Fallopian tube origin of supposed ovarian high-grade serous carcinomas. *Clinics*. 2011;66(1):73-6.
18. Tone AA, Begley H, Sharma M, Murphy J, Rosen B, Brown TJ, et al. Gene expression profiles of luteal phase fallopian tube epithelium from BRCA mutation carriers resemble high-grade serous carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(13):4067-78.
19. Kuhn E, Kurman RJ, Vang R, Sehdev AS, Han G, Soslow R, et al. TP53 mutations in serous tubal intraepithelial carcinoma and concurrent pelvic high-grade serous carcinoma--

evidence supporting the clonal relationship of the two lesions. *The Journal of pathology*. 2012;226(3):421-6.

20. Kuhn E, Meeker A, Wang TL, Sehdev AS, Kurman RJ, Shih Ie M. Shortened telomeres in serous tubal intraepithelial carcinoma: an early event in ovarian high-grade serous carcinogenesis. *The American journal of surgical pathology*. 2010;34(6):829-36.

21. Davidson B, Trope CG. Ovarian cancer: diagnostic, biological and prognostic aspects. *Women's health*. 2014;10(5):519-33.

22. Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2012;460(3):237-49.

23. Kurman RJ, Shih Ie M. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *The American journal of pathology*. 2016;186(4):733-47.

24. Gilks CB, Prat J. Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. *Human pathology*. 2009;40(9):1213-23.

25. Vang R, Shih Ie M, Kurman RJ. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Advances in anatomic pathology*. 2009;16(5):267-82.

26. Kobel M, Huntsman D, Gilks CB. Critical molecular abnormalities in high-grade serous carcinoma of the ovary. *Expert reviews in molecular medicine*. 2008;10:e22.

27. Cancer Genome Atlas Research N. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011;474(7353):609-15.

28. Gershenson DM, Sun CC, Lu KH, Coleman RL, Sood AK, Malpica A, et al. Clinical behavior of stage II-IV low-grade serous carcinoma of the ovary. *Obstetrics and gynecology*. 2006;108(2):361-8.

29. Malpica A, Deavers MT, Lu K, Bodurka DC, Atkinson EN, Gershenson DM, et al. Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *The American journal of surgical pathology*. 2004;28(4):496-504.

30. Singer G, Oldt R, 3rd, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ, et al. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(6):484-6.

31. Grisham RN, Iyer G, Garg K, DeLair D, Hyman DM, Zhou Q, et al. BRAF mutation is associated with early stage disease and improved outcome in patients with low-grade serous ovarian cancer. *Cancer*. 2013;119(3):548-54.

32. McMeekin DS, Burger RA, Manetta A, DiSaia P, Berman ML. Endometrioid adenocarcinoma of the ovary and its relationship to endometriosis. *Gynecologic oncology*. 1995;59(1):81-6.

33. Irving JA, Catasus L, Gallardo A, Bussaglia E, Romero M, Matias-Guiu X, et al. Synchronous endometrioid carcinomas of the uterine corpus and ovary: alterations in the beta-catenin (CTNNB1) pathway are associated with independent primary tumors and favorable prognosis. *Human pathology*. 2005;36(6):605-19.

34. Aguirre P, Thor AD, Scully RE. Ovarian endometrioid carcinomas resembling sex cord-stromal tumors. An immunohistochemical study. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 1989;8(4):364-73.

35. Young RH, Prat J, Scully RE. Ovarian endometrioid carcinomas resembling sex cord-stromal tumors. A clinicopathological analysis of 13 cases. *The American journal of surgical pathology*. 1982;6(6):513-22.

36. Tothill RW, Tinker AV, George J, Brown R, Fox SB, Lade S, et al. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(16):5198-208.

37. Gamallo C, Palacios J, Moreno G, Calvo de Mora J, Suarez A, Armas A. beta-catenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas : relationship with beta-catenin gene mutations, clinicopathological features, and clinical outcome. *The American journal of pathology*. 1999;155(2):527-36.
38. Sato N, Tsunoda H, Nishida M, Morishita Y, Takimoto Y, Kubo T, et al. Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of the tumor suppressor gene PTEN in benign endometrial cyst of the ovary: possible sequence progression from benign endometrial cyst to endometrioid carcinoma and clear cell carcinoma of the ovary. *Cancer research*. 2000;60(24):7052-6.
39. Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, Zeng T, et al. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *The New England journal of medicine*. 2010;363(16):1532-43.
40. Gras E, Catasus L, Arguelles R, Moreno-Bueno G, Palacios J, Gamallo C, et al. Microsatellite instability, MLH-1 promoter hypermethylation, and frameshift mutations at coding mononucleotide repeat microsatellites in ovarian tumors. *Cancer*. 2001;92(11):2829-36.
41. Moreno-Bueno G, Gamallo C, Perez-Gallego L, de Mora JC, Suarez A, Palacios J. beta-Catenin expression pattern, beta-catenin gene mutations, and microsatellite instability in endometrioid ovarian carcinomas and synchronous endometrial carcinomas. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*. 2001;10(2):116-22.
42. Orezza JP, Russell AH, Oliva E, Del Carmen MG, Eichhorn J, Fuller AF. Prognostic implication of endometriosis in clear cell carcinoma of the ovary. *Gynecologic oncology*. 2008;110(3):336-44.
43. Han G, Gilks CB, Leung S, Ewanowich CA, Irving JA, Longacre TA, et al. Mixed ovarian epithelial carcinomas with clear cell and serous components are variants of high-grade serous carcinoma: an interobserver correlative and immunohistochemical study of 32 cases. *The American journal of surgical pathology*. 2008;32(7):955-64.
44. Silva EG, Young RH. Endometrioid neoplasms with clear cells: a report of 21 cases in which the alteration is not of typical secretory type. *The American journal of surgical pathology*. 2007;31(8):1203-8.
45. Kobel M, Kalloger SE, Carrick J, Huntsman D, Asad H, Oliva E, et al. A limited panel of immunomarkers can reliably distinguish between clear cell and high-grade serous carcinoma of the ovary. *The American journal of surgical pathology*. 2009;33(1):14-21.
46. Hart WR. Mucinous tumors of the ovary: a review. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2005;24(1):4-25.
47. Cuatrecasas M, Villanueva A, Matias-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: a clinicopathologic and molecular study of 95 cases. *Cancer*. 1997;79(8):1581-6.
48. Mackenzie R, Kommoss S, Winterhoff BJ, Kipp BR, Garcia JJ, Voss J, et al. Targeted deep sequencing of mucinous ovarian tumors reveals multiple overlapping RAS-pathway activating mutations in borderline and cancerous neoplasms. *BMC cancer*. 2015;15:415.
49. McAlpine JN, Wiegand KC, Vang R, Ronnett BM, Adamiak A, Kobel M, et al. HER2 overexpression and amplification is present in a subset of ovarian mucinous carcinomas and can be targeted with trastuzumab therapy. *BMC cancer*. 2009;9:433.
50. Prat J, Oncology FCoG. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2014;124(1):1-5.
51. Cannistra S, Gershenson D, Recht A. Ovarian Cancer, Fallopian Tube Carcinoma and Peritoneal Carcinoma. In: De Vita VT, Jr., Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 2. 9 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.



52. Bast RC, Jr., Hennessy B, Mills GB. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(6):415-28.
53. Cheng B, Lu W, Xiaoyun W, YaXia C, Xie X. Extra-abdominal metastases from epithelial ovarian carcinoma: an analysis of 20 cases. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2009;19(4):611-4.
54. Ziegler J, Gliedman P, Fass D, Beckman M, Neophytides A, Steinfeld A. Brain metastases from ovarian cancer. *Journal of neuro-oncology*. 1987;5(3):211-5.
55. Zhou JJ, Miao XY. Gastric metastasis from ovarian carcinoma: a case report and literature review. *World journal of gastroenterology*. 2012;18(43):6341-4.
56. Sekine M, Yoshihara K, Komata D, Haino K, Nishino K, Tanaka K. Increased incidence of brain metastases in BRCA1-related ovarian cancers. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 2013;39(1):292-6.
57. Friedman GD, Skilling JS, Udaltsova NV, Smith LH. Early symptoms of ovarian cancer: a case-control study without recall bias. *Family practice*. 2005;22(5):548-53.
58. Vergote I, De Brabanter J, Fyles A, Bertelsen K, Einhorn N, Sevelde P, et al. Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian carcinoma. *Lancet*. 2001;357(9251):176-82.
59. Stuart GC, Kitchener H, Bacon M, duBois A, Friedlander M, Ledermann J, et al. 2010 Gynecologic Cancer InterGroup (GCIg) consensus statement on clinical trials in ovarian cancer: report from the Fourth Ovarian Cancer Consensus Conference. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2011;21(4):750-5.
60. Young RC, Walton LA, Ellenberg SS, Homesley HD, Wilbanks GD, Decker DG, et al. Adjuvant therapy in stage I and stage II epithelial ovarian cancer. Results of two prospective randomized trials. *The New England journal of medicine*. 1990;322(15):1021-7.
61. Trimbos JB, Vergote I, Bolis G, Vermorken JB, Mangioni C, Madronal C, et al. Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(2):113-25.
62. Tewari D, Java JJ, Salani R, Armstrong DK, Markman M, Herzog T, et al. Long-term survival advantage and prognostic factors associated with intraperitoneal chemotherapy treatment in advanced ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(13):1460-6.
63. du Bois A, Luck HJ, Meier W, Adams HP, Mobus V, Costa S, et al. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(17):1320-9.
64. Pfisterer J, Plante M, Vergote I, du Bois A, Hirte H, Lacave AJ, et al. Gemcitabine plus carboplatin compared with carboplatin in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: an intergroup trial of the AGO-OVAR, the NCIC CTG, and the EORTC GCG. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(29):4699-707.
65. Pujade-Lauraine E, Wagner U, Aavall-Lundqvist E, Gebiski V, Heywood M, Vasey PA, et al. Pegylated liposomal Doxorubicin and Carboplatin compared with Paclitaxel and Carboplatin for patients with platinum-sensitive ovarian cancer in late relapse. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(20):3323-9.
66. Parmar MK, Ledermann JA, Colombo N, du Bois A, Delaloye JF, Kristensen GB, et al. Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial. *Lancet*. 2003;361(9375):2099-106.
67. Monk BJ, Herzog TJ, Kaye SB, Krasner CN, Vermorken JB, Muggia FM, et al. Trabectedin plus pegylated liposomal Doxorubicin in recurrent ovarian cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(19):3107-14.

68. Kaye SB, Colombo N, Monk BJ, Tjulandin S, Kong B, Roy M, et al. Trabectedin plus pegylated liposomal doxorubicin in relapsed ovarian cancer delays third-line chemotherapy and prolongs the platinum-free interval. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2011;22(1):49-58.
69. Luvero D, Milani A, Ledermann JA. Treatment options in recurrent ovarian cancer: latest evidence and clinical potential. *Therapeutic advances in medical oncology*. 2014;6(5):229-39.
70. Burger RA. Overview of anti-angiogenic agents in development for ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2011;121(1):230-8.
71. Yap TA, Sandhu SK, Carden CP, de Bono JS. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors: Exploiting a synthetic lethal strategy in the clinic. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(1):31-49.
72. Oza AM, Cook AD, Pfisterer J, Embleton A, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, et al. Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomised trial. *The Lancet Oncology*. 2015;16(8):928-36.
73. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *The New England journal of medicine*. 2011;365(26):2473-83.
74. Aghajanian C, Blank SV, Goff BA, Judson PL, Teneriello MG, Husain A, et al. OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(17):2039-45.
75. Pujade-Lauraine E, Hilpert F, Weber B, Reuss A, Poveda A, Kristensen G, et al. Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: The AURELIA open-label randomized phase III trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(13):1302-8.
76. Symeonides S, Gourley C. Ovarian Cancer Molecular Stratification and Tumor Heterogeneity: A Necessity and a Challenge. *Frontiers in oncology*. 2015;5:229.
77. Monk BJ, Pujade-Lauraine E, Burger RA. Integrating bevacizumab into the management of epithelial ovarian cancer: the controversy of front-line versus recurrent disease. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24 Suppl 10:x53-x8.
78. Ledermann JA, Embleton AC, Raja F, Perren TJ, Jayson GC, Rustin GJ, et al. Cediranib in patients with relapsed platinum-sensitive ovarian cancer (ICON6): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2016;387(10023):1066-74.
79. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2014;15(8):852-61.
80. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *The New England journal of medicine*. 2012;366(15):1382-92.
81. Ledermann JA. PARP inhibitors in ovarian cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2016;27 Suppl 1:i40-i4.
82. Ledermann JA, Drew Y, Kristeleit RS. Homologous recombination deficiency and ovarian cancer. *European journal of cancer*. 2016;60:49-58.
83. Patch AM, Christie EL, Etemadmoghadam D, Garsed DW, George J, Fereday S, et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature*. 2015;521(7553):489-94.

84. Lloyd KL, Cree IA, Savage RS. Prediction of resistance to chemotherapy in ovarian cancer: a systematic review. *BMC cancer*. 2015;15:117.
85. Oldenhuis CN, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EG. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *European journal of cancer*. 2008;44(7):946-53.
86. du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer*. 2009;115(6):1234-44.
87. Omura GA, Brady MF, Homesley HD, Yordan E, Major FJ, Buchsbaum HJ, et al. Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1991;9(7):1138-50.
88. Sugiyama T, Kamura T, Kigawa J, Terakawa N, Kikuchi Y, Kita T, et al. Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer*. 2000;88(11):2584-9.
89. Hess V, A'Hern R, Nasiri N, King DM, Blake PR, Barton DP, et al. Mucinous epithelial ovarian cancer: a separate entity requiring specific treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(6):1040-4.
90. Badgwell D, Bast RC, Jr. Early detection of ovarian cancer. *Disease markers*. 2007;23(5-6):397-410.
91. Topalak O, Saygili U, Soyuturk M, Karaca N, Batur Y, Uslu T, et al. Serum, pleural effusion, and ascites CA-125 levels in ovarian cancer and nonovarian benign and malignant diseases: a comparative study. *Gynecologic oncology*. 2002;85(1):108-13.
92. Rustin GJ, Vergote I, Eisenhauer E, Pujade-Lauraine E, Quinn M, Thigpen T, et al. Definitions for response and progression in ovarian cancer clinical trials incorporating RECIST 1.1 and CA 125 agreed by the Gynecological Cancer Intergroup (GCIg). *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2011;21(2):419-23.
93. Slodkowska EA, Ross JS. MammaPrint 70-gene signature: another milestone in personalized medical care for breast cancer patients. *Expert review of molecular diagnostics*. 2009;9(5):417-22.
94. Kaklamani V. A genetic signature can predict prognosis and response to therapy in breast cancer: Oncotype DX. *Expert review of molecular diagnostics*. 2006;6(6):803-9.
95. You YN, Rustin RB, Sullivan JD. Oncotype DX((R)) colon cancer assay for prediction of recurrence risk in patients with stage II and III colon cancer: A review of the evidence. *Surgical oncology*. 2015;24(2):61-6.
96. Knezevic D, Goddard AD, Natraj N, Cherbavaz DB, Clark-Langone KM, Snable J, et al. Analytical validation of the Oncotype DX prostate cancer assay - a clinical RT-PCR assay optimized for prostate needle biopsies. *BMC genomics*. 2013;14:690.
97. Martin M, Brase JC, Ruiz A, Prat A, Kronenwett R, Calvo L, et al. Prognostic ability of EndoPredict compared to research-based versions of the PAM50 risk of recurrence (ROR) scores in node-positive, estrogen receptor-positive, and HER2-negative breast cancer. A GEICAM/9906 sub-study. *Breast cancer research and treatment*. 2016;156(1):81-9.
98. Sfakianos GP, Iversen ES, Whitaker R, Akushevich L, Schildkraut JM, Murphy SK, et al. Validation of ovarian cancer gene expression signatures for survival and subtype in formalin fixed paraffin embedded tissues. *Gynecologic oncology*. 2013;129(1):159-64.
99. Guo Y, Fu P, Zhu H, Reed E, Remick SC, Petros W, et al. Correlations among ERCC1, XPB, UBE2I, EGF, TAL2 and ILF3 revealed by gene signatures of histological subtypes of patients with epithelial ovarian cancer. *Oncology reports*. 2012;27(1):286-92.

100. Tan TZ, Yang H, Ye J, Low J, Choolani M, Tan DS, et al. CSIOVDB: a microarray gene expression database of epithelial ovarian cancer subtype. *Oncotarget*. 2015.
101. Gourley C, McCavigan A, Perren T, Paul J, Ogilvie Michie C, Churchman M, et al. Molecular subgroup of high-grade serous ovarian cancer (HGSOC) as a predictor of outcome following bevacizumab. 2014 ASCO Annual Meeting; Chicago: *J Clin Oncol* 32:5s (suppl; abstr 5502); 2014.
102. Dressman HK, Berchuck A, Chan G, Zhai J, Bild A, Sayer R, et al. An integrated genomic-based approach to individualized treatment of patients with advanced-stage ovarian cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(5):517-25.
103. Helleman J, Smid M, Jansen MP, van der Burg ME, Berns EM. Pathway analysis of gene lists associated with platinum-based chemotherapy resistance in ovarian cancer: the big picture. *Gynecologic oncology*. 2010;117(2):170-6.
104. Kang J, D'Andrea AD, Kozono D. A DNA repair pathway-focused score for prediction of outcomes in ovarian cancer treated with platinum-based chemotherapy. *Journal of the National Cancer Institute*. 2012;104(9):670-81.
105. Verhaak RG, Tamayo P, Yang JY, Hubbard D, Zhang H, Creighton CJ, et al. Prognostically relevant gene signatures of high-grade serous ovarian carcinoma. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(1):517-25.
106. Mak MP, Tong P, Diao L, Cardnell RJ, Gibbons DL, William WN, et al. A Patient-Derived, Pan-Cancer EMT Signature Identifies Global Molecular Alterations and Immune Target Enrichment Following Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(3):609-20.
107. Pal MK, Jaiswar SP, Dwivedi VN, Tripathi AK, Dwivedi A, Sankhwar P. MicroRNA: a new and promising potential biomarker for diagnosis and prognosis of ovarian cancer. *Cancer biology & medicine*. 2015;12(4):328-41.
108. Gallagher DJ, Konner JA, Bell-McGuinn KM, Bhatia J, Sabbatini P, Aghajanian CA, et al. Survival in epithelial ovarian cancer: a multivariate analysis incorporating BRCA mutation status and platinum sensitivity. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2011;22(5):1127-32.
109. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(12):1776-84.
110. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta anatomica*. 1995;154(1):8-20.
111. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(6):1438-49.
112. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(2):131-42.
113. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
114. Martin-Belmonte F, Perez-Moreno M. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(1):23-38.
115. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer research*. 2006;66(17):8319-26.
116. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(6):1420-8.
117. Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(6):1417-9.
118. Davidson B, Trope CG, Reich R. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma. *Frontiers in oncology*. 2012;2:33.

119. Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T, Chiarugi P. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *The Journal of pathology*. 2012;226(2):380-93.
120. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental cell*. 2008;14(6):818-29.
121. Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology*. 2007;50(1):151-62.
122. Franci C, Takkunen M, Dave N, Alameda F, Gomez S, Rodriguez R, et al. Expression of Snail protein in tumor-stroma interface. *Oncogene*. 2006;25(37):5134-44.
123. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(18):10356-61.
124. Becker KF, Rosivatz E, Blehschmidt K, Kremmer E, Sarbia M, Hofler H. Analysis of the E-cadherin repressor Snail in primary human cancers. *Cells, tissues, organs*. 2007;185(1-3):204-12.
125. Kurrey NK, K A, Bapat SA. Snail and Slug are major determinants of ovarian cancer invasiveness at the transcription level. *Gynecologic oncology*. 2005;97(1):155-65.
126. Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Yamashita M, Ino K, Nawa A, et al. Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. *International journal of oncology*. 2007;31(2):277-83.
127. Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S, Yang J. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer cell*. 2012;22(6):725-36.
128. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of cell biology*. 2006;172(7):973-81.
129. Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1796(2):75-90.
130. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature reviews Cancer*. 2007;7(6):415-28.
131. Wu Y, Zhou BP. Snail: More than EMT. *Cell adhesion & migration*. 2010;4(2):199-203.
132. Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002;3(3):155-66.
133. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature cell biology*. 2000;2(2):76-83.
134. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature cell biology*. 2000;2(2):84-9.
135. Olmeda D, Jorda M, Peinado H, Fabra A, Cano A. Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene*. 2007;26(13):1862-74.
136. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *Journal of cell science*. 2003;116(Pt 3):499-511.
137. Postigo AA. Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway. *The EMBO journal*. 2003;22(10):2443-52.
138. Postigo AA, Depp JL, Taylor JJ, Kroll KL. Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *The EMBO journal*. 2003;22(10):2453-62.

139. Franco HL, Casasnovas J, Rodriguez-Medina JR, Cadilla CL. Redundant or separate entities?--roles of Twist1 and Twist2 as molecular switches during gene transcription. *Nucleic acids research*. 2011;39(4):1177-86.
140. Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C, et al. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer cell*. 2008;14(1):79-89.
141. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 2004;117(7):927-39.
142. Pharoah PD, Guilford P, Caldas C, International Gastric Cancer Linkage C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology*. 2001;121(6):1348-53.
143. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*. 1998;392(6674):402-5.
144. Liu Y, Hong Y, Zhao Y, Ismail TM, Wong Y, Eu KW. Histone H3 (lys-9) deacetylation is associated with transcriptional silencing of E-cadherin in colorectal cancer cell lines. *Cancer investigation*. 2008;26(6):575-82.
145. Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(1):306-19.
146. Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, Hirohashi S. Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(16):7416-9.
147. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *Journal of cell science*. 2008;121(Pt 6):727-35.
148. Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *The Journal of cell biology*. 2000;148(4):779-90.
149. Islam S, Carey TE, Wolf GT, Wheelock MJ, Johnson KR. Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. *The Journal of cell biology*. 1996;135(6 Pt 1):1643-54.
150. Patel IS, Madan P, Getsios S, Bertrand MA, MacCalman CD. Cadherin switching in ovarian cancer progression. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2003;106(2):172-7.
151. Hudson LG, Zeineldin R, Stack MS. Phenotypic plasticity of neoplastic ovarian epithelium: unique cadherin profiles in tumor progression. *Clinical & experimental metastasis*. 2008;25(6):643-55.
152. Davidson B, Berner A, Nesland JM, Risberg B, Berner HS, Trope CG, et al. E-cadherin and alpha-, beta-, and gamma-catenin protein expression is up-regulated in ovarian carcinoma cells in serous effusions. *The Journal of pathology*. 2000;192(4):460-9.
153. Lopez-Novoa JM, Nieto MA. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO molecular medicine*. 2009;1(6-7):303-14.
154. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry*. 1998;67:753-91.
155. Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 16):3573-84.
156. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003;425(6958):577-84.
157. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature genetics*. 2001;29(2):117-29.

158. Schmid P, Itin P, Rufli T. In situ analysis of transforming growth factors-beta (TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3) and TGF-beta type II receptor expression in basal cell carcinomas. *The British journal of dermatology*. 1996;134(6):1044-51.
159. Schmid P, Itin P, Rufli T. In situ analysis of transforming growth factor-beta s (TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3), and TGF-beta type II receptor expression in malignant melanoma. *Carcinogenesis*. 1995;16(7):1499-503.
160. Tsushima H, Kawata S, Tamura S, Ito N, Shirai Y, Kiso S, et al. High levels of transforming growth factor beta 1 in patients with colorectal cancer: association with disease progression. *Gastroenterology*. 1996;110(2):375-82.
161. Higashi T, Sasagawa T, Inoue M, Oka R, Shuangying L, Saijoh K. Overexpression of latent transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) binding protein 1 (LTBP-1) in association with TGF-beta 1 in ovarian carcinoma. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 2001;92(5):506-15.
162. Grotegut S, von Schweinitz D, Christofori G, Lehembre F. Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *The EMBO journal*. 2006;25(15):3534-45.
163. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*. 2005;132(14):3151-61.
164. Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2001;23(10):912-23.
165. Yue P, Zhang X, Paladino D, Sengupta B, Ahmad S, Holloway RW, et al. Hyperactive EGF receptor, Jaks and Stat3 signaling promote enhanced colony-forming ability, motility and migration of cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Oncogene*. 2012;31(18):2309-22.
166. Bartlett JM, Langdon SP, Simpson BJ, Stewart M, Katsaros D, Sismondi P, et al. The prognostic value of epidermal growth factor receptor mRNA expression in primary ovarian cancer. *British journal of cancer*. 1996;73(3):301-6.
167. Rivera F, Vega-Villegas ME, Lopez-Brea MF. Cetuximab, its clinical use and future perspectives. *Anti-cancer drugs*. 2008;19(2):99-113.
168. Yingling JM, Blanchard KL, Sawyer JS. Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. *Nature reviews Drug discovery*. 2004;3(12):1011-22.
169. Glaysher S, Bolton LM, Johnson P, Atkey N, Dyson M, Torrance C, et al. Targeting EGFR and PI3K pathways in ovarian cancer. *British journal of cancer*. 2013;109(7):1786-94.
170. Ahmed N, Maines-Bandiera S, Quinn MA, Unger WG, Dedhar S, Auersperg N. Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *American journal of physiology Cell physiology*. 2006;290(6):C1532-42.
171. Vergara D, Merlot B, Lucot JP, Collinet P, Vinatier D, Fournier I, et al. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer. *Cancer letters*. 2010;291(1):59-66.
172. Sowter HM, Corps AN, Smith SK. Hepatocyte growth factor (HGF) in ovarian epithelial tumour fluids stimulates the migration of ovarian carcinoma cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1999;83(4):476-80.
173. Di Renzo MF, Olivero M, Katsaros D, Crepaldi T, Gaglia P, Zola P, et al. Overexpression of the Met/HGF receptor in ovarian cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1994;58(5):658-62.
174. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell research*. 2009;19(2):156-72.
175. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 2004;303(5663):1483-7.
176. Grego-Bessa J, Diez J, Timmerman L, de la Pompa JL. Notch and epithelial-mesenchyme transition in development and tumor progression: another turn of the screw. *Cell cycle*. 2004;3(6):718-21.

177. Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, Bertran E, Perez-Pomares JM, Diez J, et al. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes & development*. 2004;18(1):99-115.
178. Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, Poellinger L, Lendahl U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(17):6392-7.
179. Gheldof A, Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Progress in molecular biology and translational science*. 2013;116:317-36.
180. Katt ME, Placone AL, Wong AD, Xu ZS, Searson PC. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2016;4:12.
181. Castaño Orozco ME. Cultivos celulares. *Principios de Virología*. Colombia: Biogénesis; 2008. p. 100-10.
182. Gillet JP, Calcagno AM, Varma S, Marino M, Green LJ, Vora MI, et al. Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(46):18708-13.
183. Acevedo Fernández JJ, Angeles Chimal, J.S., Rivera, H.M., Petricevich López, V.L., Nolasco Quintana, N.Y., Collí Magaña, D.Y. & Santa-Olalla Tapia, J. Modelos in vitro para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos. In: M. Segura Campos LCG, D. Betancur Ancona editor. *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias* Barcelona: OmniaScience; 2013. p. 29-82.
184. Fichorova RN, Rheinwald JG, Anderson DJ. Generation of papillomavirus-immortalized cell lines from normal human ectocervical, endocervical, and vaginal epithelium that maintain expression of tissue-specific differentiation proteins. *Biology of reproduction*. 1997;57(4):847-55.
185. Domcke S, Sinha R, Levine DA, Sander C, Schultz N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nature communications*. 2013;4:2126.
186. Anglesio MS, Wiegand KC, Melnyk N, Chow C, Salamanca C, Prentice LM, et al. Type-specific cell line models for type-specific ovarian cancer research. *PloS one*. 2013;8(9):e72162.
187. Jacob F, Nixdorf S, Hacker NF, Heinzelmann-Schwarz VA. Reliable in vitro studies require appropriate ovarian cancer cell lines. *Journal of ovarian research*. 2014;7:60.
188. Keepers YP, Pizao PE, Peters GJ, van Ark-Otte J, Winograd B, Pinedo HM. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *European journal of cancer*. 1991;27(7):897-900.
189. Longo-Sorbello GSA, Saydam G, Banerjee D, Bertino JR. Cytotoxicity and Cell Growth Assays In: Celis JE, editor. *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. 1. 3 ed. Burlington: Academic Press; 2006. p. 315-24.
190. Noguchi PD, Johnson JB, Browne W. Measurement of DNA synthesis by flow cytometry. *Cytometry*. 1981;1(6):390-3.
191. Vinci M, Box C, Zimmermann M, Eccles SA. Tumor spheroid-based migration assays for evaluation of therapeutic agents. *Methods in molecular biology*. 2013;986:253-66.
192. Lefranc F, Brothi J, Kiss R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(10):2411-22.
193. Patel V, Rosenfeldt HM, Lyons R, Servitja JM, Bustelo XR, Siroff M, et al. Persistent activation of Rac1 in squamous carcinomas of the head and neck: evidence for an EGFR/Vav2 signaling axis involved in cell invasion. *Carcinogenesis*. 2007;28(6):1145-52.
194. Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(8):591-602.



195. Riahi R, Yang Y, Zhang DD, Wong PK. Advances in wound-healing assays for probing collective cell migration. *Journal of laboratory automation*. 2012;17(1):59-65.
196. Kenny HA, Krausz T, Yamada SD, Lengyel E. Use of a novel 3D culture model to elucidate the role of mesothelial cells, fibroblasts and extra-cellular matrices on adhesion and invasion of ovarian cancer cells to the omentum. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2007;121(7):1463-72.
197. Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia*. 2015;17(1):1-15.
198. Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*. 2007;130(4):601-10.
199. Kim JB. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Seminars in cancer biology*. 2005;15(5):365-77.
200. Niero EL, Rocha-Sales B, Lauand C, Cortez BA, de Souza MM, Rezende-Teixeira P, et al. The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2014;33:37.
201. Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, Court W, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC biology*. 2012;10:29.
202. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *Journal of biotechnology*. 2010;148(1):3-15.
203. Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(3):5517-27.
204. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(10):839-45.
205. Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*. 1971;46(1):113-20.
206. Longati P, Jia X, Eimer J, Wagman A, Witt MR, Rehnmark S, et al. 3D pancreatic carcinoma spheroids induce a matrix-rich, chemoresistant phenotype offering a better model for drug testing. *BMC cancer*. 2013;13:95.
207. Yang TM, Barbone D, Fennell DA, Broaddus VC. Bcl-2 family proteins contribute to apoptotic resistance in lung cancer multicellular spheroids. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2009;41(1):14-23.
208. Lee SY, Jeong EK, Jeon HM, Kim CH, Kang HS. Implication of necrosis-linked p53 aggregation in acquired apoptotic resistance to 5-FU in MCF-7 multicellular tumour spheroids. *Oncology reports*. 2010;24(1):73-9.
209. Dong Y, Stephens C, Walpole C, Swedberg JE, Boyle GM, Parsons PG, et al. Paclitaxel resistance and multicellular spheroid formation are induced by kallikrein-related peptidase 4 in serous ovarian cancer cells in an ascites mimicking microenvironment. *PloS one*. 2013;8(2):e57056.
210. Loessner D, Stok KS, Lutolf MP, Huttmacher DW, Clements JA, Rizzi SC. Bioengineered 3D platform to explore cell-ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells. *Biomaterials*. 2010;31(32):8494-506.
211. Chen J, Wang J, Chen D, Yang J, Yang C, Zhang Y, et al. Evaluation of characteristics of CD44+CD117+ ovarian cancer stem cells in three dimensional basement membrane extract scaffold versus two dimensional monocultures. *BMC cell biology*. 2013;14:7.
212. Sodek KL, Ringuette MJ, Brown TJ. Compact spheroid formation by ovarian cancer cells is associated with contractile behavior and an invasive phenotype. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2009;124(9):2060-70.
213. Lee JM, Mhawech-Fauceglia P, Lee N, Parsanian LC, Lin YG, Gayther SA, et al. A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial

- ovarian cancer cells in vitro. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 2013;93(5):528-42.
214. Butler JM, Kobayashi H, Rafii S. Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. *Nature reviews Cancer*. 2010;10(2):138-46.
  215. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
  216. Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(11):759-71.
  217. White EA, Kenny HA, Lengyel E. Three-dimensional modeling of ovarian cancer. *Advanced drug delivery reviews*. 2014;79-80:184-92.
  218. Thoma CR, Zimmermann M, Agarkova I, Kelm JM, Krek W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Advanced drug delivery reviews*. 2014;69-70:29-41.
  219. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013;501(7467):346-54.
  220. Rosales-Nieves AE, Gonzalez-Reyes A. Genetics and mechanisms of ovarian cancer: parallels between *Drosophila* and humans. *Seminars in cell & developmental biology*. 2014;28:104-9.
  221. Fong MY, Kakar SS. Ovarian cancer mouse models: a summary of current models and their limitations. *Journal of ovarian research*. 2009;2(1):12.
  222. Bernardo AM, Thorsteinsdottir S, Mummery CL. Advantages of the avian model for human ovarian cancer. *Molecular and clinical oncology*. 2015;3(6):1191-8.
  223. Johnson PA, Giles JR. The hen as a model of ovarian cancer. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(6):432-6.
  224. Frese KK, Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(9):645-58.
  225. Cheon DJ, Orsulic S. Mouse models of cancer. *Annual review of pathology*. 2011;6:95-119.
  226. House CD, Hernandez L, Annunziata CM. Recent technological advances in using mouse models to study ovarian cancer. *Frontiers in oncology*. 2014;4:26.
  227. Boone JD, Dobbin ZC, Straughn JM, Jr., Buchsbaum DJ. Ovarian and cervical cancer patient derived xenografts: The past, present, and future. *Gynecologic oncology*. 2015;138(2):486-91.
  228. Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nature reviews Clinical oncology*. 2012;9(6):338-50.
  229. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature reviews Drug discovery*. 2004;3(5):391-400.
  230. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nature reviews Drug discovery*. 2006;5(10):835-44.
  231. Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, Ngan L, et al. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PloS one*. 2008;3(6):e2428.
  232. Dobbin ZC, Katre AA, Steg AD, Erickson BK, Shah MM, Alvarez RD, et al. Using heterogeneity of the patient-derived xenograft model to identify the chemoresistant population in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2014;5(18):8750-64.
  233. Scott CL, Mackay HJ, Haluska P, Jr. Patient-derived xenograft models in gynecologic malignancies. *American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO American Society of Clinical Oncology Meeting*. 2014:e258-66.

234. Bankert RB, Balu-Iyer SV, Odunsi K, Shultz LD, Kelleher RJ, Jr., Barnas JL, et al. Humanized mouse model of ovarian cancer recapitulates patient solid tumor progression, ascites formation, and metastasis. *PloS one*. 2011;6(9):e24420.
235. Werooha SJ, Becker MA, Enderica-Gonzalez S, Harrington SC, Oberg AL, Maurer MJ, et al. Tumorgrafts as in vivo surrogates for women with ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(5):1288-97.
236. Topp MD, Hartley L, Cook M, Heong V, Boehm E, McShane L, et al. Molecular correlates of platinum response in human high-grade serous ovarian cancer patient-derived xenografts. *Molecular oncology*. 2014;8(3):656-68.
237. Bobbs AS, Cole JM, Cowden Dahl KD. Emerging and Evolving Ovarian Cancer Animal Models. *Cancer growth and metastasis*. 2015;8(Suppl 1):29-36.
238. Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinska E, Byrne AT, Caldas C, et al. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer discovery*. 2014;4(9):998-1013.
239. Barua A, Bitterman P, Abramowicz JS, Dirks AL, Bahr JM, Hales DB, et al. Histopathology of ovarian tumors in laying hens: a preclinical model of human ovarian cancer. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2009;19(4):531-9.
240. Fredrickson TN. Ovarian tumors of the hen. *Environmental health perspectives*. 1987;73:35-51.
241. Trevino LS, Buckles EL, Johnson PA. Oral contraceptives decrease the prevalence of ovarian cancer in the hen. *Cancer prevention research*. 2012;5(2):343-9.
242. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European journal of cancer*. 2009;45(2):228-47.
243. Hewitt SM, Lewis FA, Cao Y, Conrad RC, Cronin M, Danenberg KD, et al. Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2008;132(12):1929-35.
244. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 2002;3(7):RESEARCH0034.
245. Mendiola M, Barriuso J, Redondo A, Marino-Enriquez A, Madero R, Espinosa E, et al. Angiogenesis-related gene expression profile with independent prognostic value in advanced ovarian carcinoma. *PloS one*. 2008;3(12):e4051.
246. Glickman ME, Rao SR, Schultz MR. False discovery rate control is a recommended alternative to Bonferroni-type adjustments in health studies. *Journal of clinical epidemiology*. 2014;67(8):850-7.
247. George B, Seals S, Aban I. Survival analysis and regression models. *Journal of nuclear cardiology : official publication of the American Society of Nuclear Cardiology*. 2014;21(4):686-94.
248. Tibshirani R. Regression Shrinkage and Selection via the Lasso. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 1996;58(1):267-88.
249. Schapire RE. The Boosting Approach to Machine Learning: An Overview. In: Denison DD, Hansen MH, Holmes CC, Mallick B, Yu B, editors. *Nonlinear Estimation and Classification*. New York, NY: Springer New York; 2003. p. 149-71.
250. Aguirre-Gamboa R, Gomez-Rueda H, Martinez-Ledesma E, Martinez-Torteya A, Chacolla-Huaringa R, Rodriguez-Barrientos A, et al. SurvExpress: an online biomarker validation tool and database for cancer gene expression data using survival analysis. *PloS one*. 2013;8(9):e74250.

251. Langdon SP, Lawrie SS, Hay FG, Hawkes MM, McDonald A, Hayward IP, et al. Characterization and properties of nine human ovarian adenocarcinoma cell lines. *Cancer research*. 1988;48(21):6166-72.
252. Beaufort CM, Helmijr JC, Piskorz AM, Hoogstraat M, Ruigrok-Ritstier K, Besselink N, et al. Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of in vitro morphological subtypes. *PloS one*. 2014;9(9):e103988.
253. April C, Klotzle B, Royce T, Wickham-Garcia E, Boyaniwsky T, Izzo J, et al. Whole-genome gene expression profiling of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples. *PloS one*. 2009;4(12):e8162.
254. Wong W, Farr R, Joglekar M, Januszewski A, Hardikar A. Probe-based Real-time PCR Approaches for Quantitative Measurement of microRNAs. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2015(98).
255. Rentoft M, Coates PJ, Laurell G, Nylander K. Transcriptional profiling of formalin fixed paraffin embedded tissue: pitfalls and recommendations for identifying biologically relevant changes. *PloS one*. 2012;7(4):e35276.
256. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Isakoff SJ, Barmettler A, Fuller A, et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer cell*. 2004;5(6):607-16.
257. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;351(27):2817-26.
258. Miller LD, Long PM, Wong L, Mukherjee S, McShane LM, Liu ET. Optimal gene expression analysis by microarrays. *Cancer cell*. 2002;2(5):353-61.
259. Armstrong RA. When to use the Bonferroni correction. *Ophthalmic & physiological optics : the journal of the British College of Ophthalmic Opticians*. 2014;34(5):502-8.
260. Simon RM, Subramanian J, Li MC, Menezes S. Using cross-validation to evaluate predictive accuracy of survival risk classifiers based on high-dimensional data. *Briefings in bioinformatics*. 2011;12(3):203-14.
261. Jolliffe IT, Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical transactions Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*. 2016;374(2065):20150202.
262. Boulesteix AL, Strimmer K. Partial least squares: a versatile tool for the analysis of high-dimensional genomic data. *Briefings in bioinformatics*. 2007;8(1):32-44.
263. de Vlaming R, Groenen PJ. The Current and Future Use of Ridge Regression for Prediction in Quantitative Genetics. *BioMed research international*. 2015;2015:143712.
264. Tibshirani R. Regression shrinkage and selection via the lasso: a retrospective. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*. 2011;73(3):273-82.
265. Bovelstad HM, Nygard S, Storvold HL, Aldrin M, Borgan O, Frigessi A, et al. Predicting survival from microarray data--a comparative study. *Bioinformatics*. 2007;23(16):2080-7.
266. Madden SF, Clarke C, Stordal B, Carey MS, Broaddus R, Gallagher WM, et al. OvMark: a user-friendly system for the identification of prognostic biomarkers in publically available ovarian cancer gene expression datasets. *Molecular cancer*. 2014;13:241.
267. Spentzos D, Levine DA, Kolia S, Otu H, Boyd J, Libermann TA, et al. Unique gene expression profile based on pathologic response in epithelial ovarian cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(31):7911-8.
268. Lisowska KM, Olbryt M, Student S, Kujawa KA, Cortez AJ, Simek K, et al. Unsupervised analysis reveals two molecular subgroups of serous ovarian cancer with distinct gene expression profiles and survival. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2016;142(6):1239-52.
269. Schwartz DR, Kardia SL, Shedden KA, Kuick R, Michailidis G, Taylor JM, et al. Gene expression in ovarian cancer reflects both morphology and biological behavior, distinguishing clear cell from other poor-prognosis ovarian carcinomas. *Cancer research*. 2002;62(16):4722-9.

270. Schaner ME, Ross DT, Ciaravino G, Sorlie T, Troyanskaya O, Diehn M, et al. Gene expression patterns in ovarian carcinomas. *Molecular biology of the cell*. 2003;14(11):4376-86.
271. Spentzos D, Levine DA, Ramoni MF, Joseph M, Gu X, Boyd J, et al. Gene expression signature with independent prognostic significance in epithelial ovarian cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(23):4700-10.
272. Gomez-Hidalgo NR, Martinez-Cannon BA, Nick AM, Lu KH, Sood AK, Coleman RL, et al. Predictors of optimal cytoreduction in patients with newly diagnosed advanced-stage epithelial ovarian cancer: Time to incorporate laparoscopic assessment into the standard of care. *Gynecologic oncology*. 2015;137(3):553-8.
273. Fagotti A, Ferrandina G, Fanfani F, Ercoli A, Lorusso D, Rossi M, et al. A laparoscopy-based score to predict surgical outcome in patients with advanced ovarian carcinoma: a pilot study. *Annals of surgical oncology*. 2006;13(8):1156-61.
274. Fagotti A, Ferrandina G, Fanfani F, Garganese G, Vizzielli G, Carone V, et al. Prospective validation of a laparoscopic predictive model for optimal cytoreduction in advanced ovarian carcinoma. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2008;199(6):642 e1-6.
275. Haslehurst AM, Koti M, Dharsee M, Nuin P, Evans K, Geraci J, et al. EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer. *BMC cancer*. 2012;12:91.
276. Latifi A, Abubaker K, Castrechini N, Ward AC, Liongue C, Dobill F, et al. Cisplatin treatment of primary and metastatic epithelial ovarian carcinomas generates residual cells with mesenchymal stem cell-like profile. *Journal of cellular biochemistry*. 2011;112(10):2850-64.
277. Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong ST, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*. 2015;527(7579):472-6.
278. Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*. 2015;527(7579):525-30.
279. Xu T, Zhang J, Chen W, Pan S, Zhi X, Wen L, et al. ARK5 promotes doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma via epithelial-mesenchymal transition. *Cancer letters*. 2016;377(2):140-8.
280. Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current opinion in cell biology*. 2002;14(5):608-16.
281. Yan Q, Sage EH. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1999;47(12):1495-506.
282. Framson PE, Sage EH. SPARC and tumor growth: where the seed meets the soil? *Journal of cellular biochemistry*. 2004;92(4):679-90.
283. Germano G, Frapolli R, Simone M, Tavecchio M, Erba E, Pesce S, et al. Antitumor and anti-inflammatory effects of trabectedin on human myxoid liposarcoma cells. *Cancer research*. 2010;70(6):2235-44.
284. Pan B, Liao Q, Niu Z, Zhou L, Zhao Y. Cancer-associated fibroblasts in pancreatic adenocarcinoma. *Future oncology*. 2015;11(18):2603-10.
285. Taylor KM, Morgan HE, Johnson A, Hadley LJ, Nicholson RI. Structure-function analysis of LIV-1, the breast cancer-associated protein that belongs to a new subfamily of zinc transporters. *The Biochemical journal*. 2003;375(Pt 1):51-9.
286. Taylor KM, Nicholson RI. The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochimica et biophysica acta*. 2003;1611(1-2):16-30.
287. Hogstrand C, Kille P, Ackland ML, Hiscox S, Taylor KM. A mechanism for epithelial-mesenchymal transition and anoikis resistance in breast cancer triggered by zinc channel ZIP6

- and STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3). *The Biochemical journal*. 2013;455(2):229-37.
288. Yamashita S, Miyagi C, Fukada T, Kagara N, Che YS, Hirano T. Zinc transporter LIV1 controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. *Nature*. 2004;429(6989):298-302.
289. Lue HW, Yang X, Wang R, Qian W, Xu RZ, Lyles R, et al. LIV-1 promotes prostate cancer epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis through HB-EGF shedding and EGFR-mediated ERK signaling. *PloS one*. 2011;6(11):e27720.
290. Unno J, Satoh K, Hirota M, Kanno A, Hamada S, Ito H, et al. LIV-1 enhances the aggressive phenotype through the induction of epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *International journal of oncology*. 2009;35(4):813-21.
291. Lian J, Jing Y, Dong Q, Huan L, Chen D, Bao C, et al. miR-192, a prognostic indicator, targets the SLC39A6/SNAIL pathway to reduce tumor metastasis in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(3):2672-83.
292. Wu C, Li D, Jia W, Hu Z, Zhou Y, Yu D, et al. Genome-wide association study identifies common variants in SLC39A6 associated with length of survival in esophageal squamous-cell carcinoma. *Nature genetics*. 2013;45(6):632-8.
293. Cui XB, Shen YY, Jin TT, Li S, Li TT, Zhang SM, et al. SLC39A6: a potential target for diagnosis and therapy of esophageal carcinoma. *Journal of translational medicine*. 2015;13:321.
294. Ma X, Duan H, Liu J, Mo Q, Sun C, Ma D, et al. Effect of LIV1 on the sensitivity of ovarian cancer cells to trichostatin A. *Oncology reports*. 2015;33(2):893-8.
295. Kasper G, Weiser AA, Rump A, Sparbier K, Dahl E, Hartmann A, et al. Expression levels of the putative zinc transporter LIV-1 are associated with a better outcome of breast cancer patients. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2005;117(6):961-73.
296. Andres SA, Brock GN, Wittliff JL. Interrogating differences in expression of targeted gene sets to predict breast cancer outcome. *BMC cancer*. 2013;13:326.
297. Sussman D, Smith LM, Anderson ME, Duniho S, Hunter JH, Kostner H, et al. SGN-LIV1A: a novel antibody-drug conjugate targeting LIV-1 for the treatment of metastatic breast cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2014;13(12):2991-3000.
298. Kaelin WG, Jr., Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular cell*. 2008;30(4):393-402.
299. Kim WY, Perera S, Zhou B, Carretero J, Yeh JJ, Heathcote SA, et al. HIF2alpha cooperates with RAS to promote lung tumorigenesis in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(8):2160-70.
300. Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O2 availability on human cancer. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(12):967-75.
301. Gravelle P, Jean C, Familiades J, Decaup E, Blanc A, Bezombes-Cagnac C, et al. Cell growth in aggregates determines gene expression, proliferation, survival, chemoresistance, and sensitivity to immune effectors in follicular lymphoma. *The American journal of pathology*. 2014;184(1):282-95.
302. Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL, et al. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(13):5675-86.
303. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Turley H, Talks K, Pezzella F, et al. Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *British journal of cancer*. 2001;85(6):881-90.
304. Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Lofstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, et al. Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer cell*. 2006;10(5):413-23.

305. Raspaglio G, Petrillo M, Martinelli E, Li Puma DD, Mariani M, De Donato M, et al. Sox9 and Hif-2alpha regulate TUBB3 gene expression and affect ovarian cancer aggressiveness. *Gene*. 2014;542(2):173-81.
306. Kildal W, Risberg B, Abeler VM, Kristensen GB, Sudbo J, Nesland JM, et al. beta-catenin expression, DNA ploidy and clinicopathological features in ovarian cancer: a study in 253 patients. *European journal of cancer*. 2005;41(8):1127-34.
307. Faleiro-Rodrigues C, Macedo-Pinto I, Pereira D, Lopes CS. Loss of beta-catenin is associated with poor survival in ovarian carcinomas. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 2004;23(4):337-46.
308. Lee CM, Shvartsman H, Deavers MT, Wang SC, Xia W, Schmandt R, et al. beta-catenin nuclear localization is associated with grade in ovarian serous carcinoma. *Gynecologic oncology*. 2003;88(3):363-8.
309. Wang H, Wang H, Makki MS, Wen J, Dai Y, Shi Q, et al. Overexpression of beta-catenin and cyclinD1 predicts a poor prognosis in ovarian serous carcinomas. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(1):264-71.
310. Barghout SH, Zepeda N, Xu Z, Steed H, Lee CH, Fu Y. Elevated beta-catenin activity contributes to carboplatin resistance in A2780cp ovarian cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;468(1-2):173-8.
311. Bodnar L, Stanczak A, Cierniak S, Smoter M, Cichowicz M, Kozłowski W, et al. Wnt/beta-catenin pathway as a potential prognostic and predictive marker in patients with advanced ovarian cancer. *Journal of ovarian research*. 2014;7:16.
312. Voutilainen KA, Anttila MA, Sillanpää SM, Ropponen KM, Saarikoski SV, Juhola MT, et al. Prognostic significance of E-cadherin-catenin complex in epithelial ovarian cancer. *Journal of clinical pathology*. 2006;59(5):460-7.
313. Parrott JA, Skinner MK. Expression and action of hepatocyte growth factor in human and bovine normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer. *Biology of reproduction*. 2000;62(3):491-500.
314. Ariyawutyakorn W, Saichaemchan S, Varella-Garcia M. Understanding and Targeting MET Signaling in Solid Tumors - Are We There Yet? *Journal of Cancer*. 2016;7(6):633-49.
315. Christensen JG, Burrows J, Salgia R. c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer letters*. 2005;225(1):1-26.
316. Aune G, Lian AM, Tingulstad S, Torp SH, Forsmo S, Reseland JE, et al. Increased circulating hepatocyte growth factor (HGF): a marker of epithelial ovarian cancer and an indicator of poor prognosis. *Gynecologic oncology*. 2011;121(2):402-6.
317. Matte I, Lane D, Laplante C, Garde-Granger P, Rancourt C, Piche A. Ovarian cancer ascites enhance the migration of patient-derived peritoneal mesothelial cells via cMet pathway through HGF-dependent and -independent mechanisms. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015;137(2):289-98.
318. Blumenschein GR, Jr., Mills GB, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the hepatocyte growth factor-cMET axis in cancer therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(26):3287-96.
319. Martin LP, Sill M, Shahin MS, Powell M, DiSilvestro P, Landrum LM, et al. A phase II evaluation of AMG 102 (rilotumumab) in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian, fallopian tube or primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology*. 2014;132(3):526-30.
320. Katoh M, Katoh M. Identification and characterization of human SNAIL3 (SNAI3) gene in silico. *International journal of molecular medicine*. 2003;11(3):383-8.
321. Knappe N, Novak D, Weina K, Bernhardt M, Reith M, Larribere L, et al. Directed Dedifferentiation Using Partial Reprogramming Induces Invasive Phenotype in Melanoma Cells. *Stem cells*. 2016;34(4):832-46.

322. Nagaraju GP, Dontula R, El-Rayes BF, Lakka SS. Molecular mechanisms underlying the divergent roles of SPARC in human carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2014;35(5):967-73.
323. Tai IT, Tang MJ. SPARC in cancer biology: its role in cancer progression and potential for therapy. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2008;11(6):231-46.
324. Gundewar C, Sasor A, Hilmersson KS, Andersson R, Ansari D. The role of SPARC expression in pancreatic cancer progression and patient survival. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2015;50(9):1170-4.
325. Han W, Cao F, Chen MB, Lu RZ, Wang HB, Yu M, et al. Prognostic Value of SPARC in Patients with Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one*. 2016;11(1):e0145803.
326. Wang CS, Lin KH, Chen SL, Chan YF, Hsueh S. Overexpression of SPARC gene in human gastric carcinoma and its clinic-pathologic significance. *British journal of cancer*. 2004;91(11):1924-30.
327. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Brekken RA, Sivridis E, Gatter KC, Harris AL, et al. Enhanced expression of SPARC/osteonectin in the tumor-associated stroma of non-small cell lung cancer is correlated with markers of hypoxia/acidity and with poor prognosis of patients. *Cancer research*. 2003;63(17):5376-80.
328. Brown TJ, Shaw PA, Karp X, Huynh MH, Begley H, Ringuette MJ. Activation of SPARC expression in reactive stroma associated with human epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 1999;75(1):25-33.
329. Paley PJ, Goff BA, Gown AM, Greer BE, Sage EH. Alterations in SPARC and VEGF immunoreactivity in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2000;78(3 Pt 1):336-41.
330. Bull Phelps SL, Carbon J, Miller A, Castro-Rivera E, Arnold S, Brekken RA, et al. Secreted protein acidic and rich in cysteine as a regulator of murine ovarian cancer growth and chemosensitivity. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2009;200(2):180 e1-7.
331. Said N, Motamed K. Absence of host-secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) augments peritoneal ovarian carcinomatosis. *The American journal of pathology*. 2005;167(6):1739-52.
332. Mok SC, Chan WY, Wong KK, Muto MG, Berkowitz RS. SPARC, an extracellular matrix protein with tumor-suppressing activity in human ovarian epithelial cells. *Oncogene*. 1996;12(9):1895-901.
333. Yiu GK, Chan WY, Ng SW, Chan PS, Cheung KK, Berkowitz RS, et al. SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells. *The American journal of pathology*. 2001;159(2):609-22.
334. Jazaeri AA, Awtrey CS, Chandramouli GV, Chuang YE, Khan J, Sotiriou C, et al. Gene expression profiles associated with response to chemotherapy in epithelial ovarian cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(17):6300-10.
335. Takai M, Terai Y, Kawaguchi H, Ashihara K, Fujiwara S, Tanaka T, et al. The EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression indicates the metastatic status and prognosis in patients with ovarian cancer. *Journal of ovarian research*. 2014;7:76.
336. Blehnschmidt K, Sassen S, Schmalfeldt B, Schuster T, Hofler H, Becker KF. The E-cadherin repressor Snail is associated with lower overall survival of ovarian cancer patients. *British journal of cancer*. 2008;98(2):489-95.
337. Jin H, Yu Y, Zhang T, Zhou X, Zhou J, Jia L, et al. Snail is critical for tumor growth and metastasis of ovarian carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010;126(9):2102-11.
338. Tuhkanen H, Soini Y, Kosma VM, Anttila M, Sironen R, Hamalainen K, et al. Nuclear expression of Snail1 in borderline and malignant epithelial ovarian tumours is associated with tumour progression. *BMC cancer*. 2009;9:289.



339. Yoshida J, Horiuchi A, Kikuchi N, Hayashi A, Osada R, Ohira S, et al. Changes in the expression of E-cadherin repressors, Snail, Slug, SIP1, and Twist, in the development and progression of ovarian carcinoma: the important role of Snail in ovarian tumorigenesis and progression. *Medical molecular morphology*. 2009;42(2):82-91.
340. Ren Y, Cheung HW, von Maltzan G, Agrawal A, Cowley GS, Weir BA, et al. Targeted tumor-penetrating siRNA nanocomplexes for credentialing the ovarian cancer oncogene ID4. *Science translational medicine*. 2012;4(147):147ra12.
341. Prislei S, Martinelli E, Zannoni GF, Petrillo M, Filippetti F, Mariani M, et al. Role and prognostic significance of the epithelial-mesenchymal transition factor ZEB2 in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2015;6(22):18966-79.
342. Singh M, Spoelstra NS, Jean A, Howe E, Torkko KC, Clark HR, et al. ZEB1 expression in type I vs type II endometrial cancers: a marker of aggressive disease. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2008;21(7):912-23.
343. Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, et al. The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene*. 2007;26(49):6979-88.
344. Sayan AE, Griffiths TR, Pal R, Browne GJ, Ruddick A, Yagci T, et al. SIP1 protein protects cells from DNA damage-induced apoptosis and has independent prognostic value in bladder cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(35):14884-9.
345. Goscinski MA, Xu R, Zhou F, Wang J, Yang H, Huang R, et al. Nuclear, cytoplasmic, and stromal expression of ZEB1 in squamous and small cell carcinoma of the esophagus. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2015;123(12):1040-7.
346. Wu DI, Liu L, Ren C, Kong D, Zhang P, Jin X, et al. Epithelial-mesenchymal interconversions and the regulatory function of the ZEB family during the development and progression of ovarian cancer. *Oncology letters*. 2016;11(2):1463-8.
347. Wong AS, Maines-Bandiera SL, Rosen B, Wheelock MJ, Johnson KR, Leung PC, et al. Constitutive and conditional cadherin expression in cultured human ovarian surface epithelium: influence of family history of ovarian cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1999;81(2):180-8.
348. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocrine reviews*. 2001;22(2):255-88.
349. Jordan NV, Johnson GL, Abell AN. Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. *Cell cycle*. 2011;10(17):2865-73.
350. Helleman J, Jansen MP, Span PN, van Staveren IL, Massuger LF, Meijer-van Gelder ME, et al. Molecular profiling of platinum resistant ovarian cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2006;118(8):1963-71.
351. Crijns AP, Fehrmann RS, de Jong S, Gerbens F, Meersma GJ, Klip HG, et al. Survival-related profile, pathways, and transcription factors in ovarian cancer. *PLoS medicine*. 2009;6(2):e24.
352. Gillet JP, Calcagno AM, Varma S, Davidson B, Bunkholt Elstrand M, Ganapathi R, et al. Multidrug resistance-linked gene signature predicts overall survival of patients with primary ovarian serous carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(11):3197-206.
353. Glaysher S, Gabriel FG, Johnson P, Polak M, Knight LA, Parker K, et al. Molecular basis of chemosensitivity of platinum pre-treated ovarian cancer to chemotherapy. *British journal of cancer*. 2010;103(5):656-62.
354. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
355. Gomez-Raposo C, Mendiola M, Barriuso J, Casado E, Hardisson D, Redondo A. Angiogenesis and ovarian cancer. *Clinical & translational oncology : official publication of the*

- Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico. 2009;11(9):564-71.
356. Mendiola M, Martinez-Marin V, Herranz J, Heredia V, Yebenes L, Zamora P, et al. Predictive value of angiogenesis-related gene profiling in patients with HER2-negative metastatic breast cancer treated with bevacizumab and weekly paclitaxel. *Oncotarget*. 2016;7(17):24217-27.
357. Jayson GC, Kerbel R, Ellis LM, Harris AL. Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet*. 2016.
358. Nelson BH. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunological reviews*. 2008;222:101-16.
359. Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautes-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010;29(8):1093-102.
360. Petrillo M, Nero C, Amadio G, Gallo D, Fagotti A, Scambia G. Targeting the hallmarks of ovarian cancer: The big picture. *Gynecologic oncology*. 2016;142(1):176-83.
361. Yang R, Xiong J, Deng D, Wang Y, Liu H, Jiang G, et al. An integrated model of clinical information and gene expression for prediction of survival in ovarian cancer patients. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2016;172:84-95 e11.
362. Han Y, Huang H, Xiao Z, Zhang W, Cao Y, Qu L, et al. Integrated analysis of gene expression profiles associated with response of platinum/paclitaxel-based treatment in epithelial ovarian cancer. *PloS one*. 2012;7(12):e52745.
363. Willis S, Villalobos VM, Gevaert O, Abramovitz M, Williams C, Sikic BI, et al. Single Gene Prognostic Biomarkers in Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *PloS one*. 2016;11(2):e0149183.
364. Murakami R, Matsumura N, Mandai M, Yoshihara K, Tanabe H, Nakai H, et al. Establishment of a Novel Histopathological Classification of High-Grade Serous Ovarian Carcinoma Correlated with Prognostically Distinct Gene Expression Subtypes. *The American journal of pathology*. 2016;186(5):1103-13.
365. Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, Zhou AY, Gupta S, Yang J, et al. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(35):15449-54.
366. Loboda A, Nebozhyn MV, Watters JW, Buser CA, Shaw PM, Huang PS, et al. EMT is the dominant program in human colon cancer. *BMC medical genomics*. 2011;4:9.
367. Chung CH, Parker JS, Ely K, Carter J, Yi Y, Murphy BA, et al. Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer research*. 2006;66(16):8210-8.
368. Marin-Aguilera M, Codony-Servat J, Reig O, Lozano JJ, Fernandez PL, Pereira MV, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition mediates docetaxel resistance and high risk of relapse in prostate cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2014;13(5):1270-84.
369. Byers LA, Diao L, Wang J, Saintigny P, Girard L, Peyton M, et al. An epithelial-mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(1):279-90.
370. Alonso SR, Tracey L, Ortiz P, Perez-Gomez B, Palacios J, Pollan M, et al. A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer research*. 2007;67(7):3450-60.
371. Kim MK, Kim MA, Kim H, Kim YB, Song YS. Expression profiles of epithelial-mesenchymal transition-associated proteins in epithelial ovarian carcinoma. *BioMed research international*. 2014;2014:495754.

372. Marchini S, Fruscio R, Clivio L, Beltrame L, Porcu L, Fuso Nerini I, et al. Resistance to platinum-based chemotherapy is associated with epithelial to mesenchymal transition in epithelial ovarian cancer. *European journal of cancer*. 2013;49(2):520-30.
373. Davidowitz RA, Selfors LM, Iwanicki MP, Elias KM, Karst A, Piao H, et al. Mesenchymal gene program-expressing ovarian cancer spheroids exhibit enhanced mesothelial clearance. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(6):2611-25.
374. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies*. 2014;12(4):207-18.
375. Naora H, Montell DJ. Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(5):355-66.
376. Shepherd TG, Theriault BL, Campbell EJ, Nachtigal MW. Primary culture of ovarian surface epithelial cells and ascites-derived ovarian cancer cells from patients. *Nature protocols*. 2006;1(6):2643-9.
377. Raghavan S, Ward MR, Rowley KR, Wold RM, Takayama S, Buckanovich RJ, et al. Formation of stable small cell number three-dimensional ovarian cancer spheroids using hanging drop arrays for preclinical drug sensitivity assays. *Gynecologic oncology*. 2015;138(1):181-9.
378. Asthana A, Kisaalita WS. Microtissue size and hypoxia in HTS with 3D cultures. *Drug discovery today*. 2012;17(15-16):810-7.
379. Huang RY, Wong MK, Tan TZ, Kuay KT, Ng AH, Chung VY, et al. An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). *Cell death & disease*. 2013;4:e915.
380. Choi PW, Yang J, Ng SK, Feltmate C, Muto MG, Hasselblatt K, et al. Loss of E-cadherin disrupts ovarian epithelial inclusion cyst formation and collective cell movement in ovarian cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(4):4110-21.
381. Yang D, Sun Y, Hu L, Zheng H, Ji P, Pecot CV, et al. Integrated analyses identify a master microRNA regulatory network for the mesenchymal subtype in serous ovarian cancer. *Cancer cell*. 2013;23(2):186-99.
382. Cunnea P, Stronach EA. Modeling platinum sensitive and resistant high-grade serous ovarian cancer: development and applications of experimental systems. *Frontiers in oncology*. 2014;4:81.
383. Stronach EA, Chen M, Maginn EN, Agarwal R, Mills GB, Wasan H, et al. DNA-PK mediates AKT activation and apoptosis inhibition in clinically acquired platinum resistance. *Neoplasia*. 2011;13(11):1069-80.
384. Li L, Liu J, Yu W, Lou X, Huang B, Lin B. Deep transcriptome profiling of ovarian cancer cells using next-generation sequencing approach. *Methods in molecular biology*. 2013;1049:139-69.
385. Thu KL, Papari-Zareei M, Stastny V, Song K, Peyton M, Martinez VD, et al. A comprehensively characterized cell line panel highly representative of clinical ovarian high-grade serous carcinomas. *Oncotarget*. 2016.
386. Yulyana Y, Ho IA, Sia KC, Newman JP, Toh XY, Endaya BB, et al. Paracrine factors of human fetal MSCs inhibit liver cancer growth through reduced activation of IGF-1R/PI3K/Akt signaling. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2015;23(4):746-56.

## IX. RESUMEN

El cáncer de ovario se asocia a una elevada mortalidad, principalmente debido a que se diagnostica en fases avanzadas de la enfermedad, y a que, pese a tener una elevada tasa de respuesta al tratamiento inicial, en una mayoría de los casos, se acabará produciendo una recidiva.

El proceso de la transición epitelio mesénquima (TEM) hace referencia a un proceso altamente regulado que implica un cambio fenotípico por el cual las células pasan de tener características epiteliales a mesenquimales, afectando a su crecimiento, migración e invasión, y se relaciona con la agresividad tumoral y el desarrollo de metástasis.

El estudio molecular de genes relacionados con la TEM en una cohorte de 84 pacientes con carcinoma de ovario avanzado, mediante RT-qPCR en tarjetas microfluídicas, ha identificado dos perfiles de expresión génica, uno para supervivencia libre de progresión (SLP), compuesto de 10 genes, y otro para supervivencia global (SG), compuesto por 6 genes. Los estudios de expresión proteica en estos tumores sugieren que HIF-2 $\alpha$ , Snail y SPARC pueden representar biomarcadores con significado pronóstico en el carcinoma de ovario.

Por otro lado, los modelos *in vitro* para el estudio de la biología molecular del cáncer han evolucionado en las últimas décadas, permitiendo solventar algunos de sus inconvenientes, como es la carencia de arquitectura tisular, con la utilización de modelos tridimensionales (3D). En este trabajo se han establecido estos modelos a partir de un panel de 16 líneas celulares de cáncer de ovario, y se han caracterizado exhaustivamente en cuanto a sus propiedades basales y a la expresión de marcadores de TEM. Estos ensayos *in vitro* han confirmado la heterogeneidad de estas líneas celulares poniendo de manifiesto, por un lado, la necesidad de seleccionar minuciosamente los modelos preclínicos en base a los objetivos de cada estudio y por otro, que, dada la peculiar vía de diseminación en estos tumores, los modelos 3D representan un buen sistema alternativo para su estudio, sobre todo en cuanto al comportamiento farmacológico. Nuestros resultados *in vitro* indican que *SLC39A6* podría estar relacionado con fenómenos de resistencia a platino y recaída.

En todo caso, estos resultados deben ser interpretados con cautela y serán necesarios estudios prospectivos de validación en series independientes, así como estudios funcionales *in vitro* para confirmar su valor pronóstico.

## X. SUMMARY

Ovarian cancer is associated with a high mortality, mainly due to the fact that patients are diagnosed with advanced disease, and even though the initial response rate to treatment is high, relapse will occur in the majority of patients.

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a highly regulated process in which cells undergo a phenotypic change and epithelial cells acquire mesenchymal characteristics that affect their growth, migration and invasion capabilities, and is related to tumor aggressiveness and metastasis development.

In this study, a molecular analysis of genes related to EMT in a cohort of 84 patients diagnosed with advanced epithelial ovarian cancer, using qRT-PCR TaqMan Low Density Arrays (TLDA), has identified two gene expression profiles; one of them predicts Progression Free Survival (PFS) and is composed of 10 genes, and the other one predicts Overall Survival (OS) and contains 6 genes. Protein expression assays in these tumors suggest that HIF-2  $\alpha$ , Snail and SPARC could represent prognostic biomarkers in ovarian cancer.

On the other hand, *in vitro* models used to study cancer's molecular biology have evolved in the last decades, overcoming some of their inconveniences, such as the lack of tissue architecture with the use of three dimensional (3D) models. In this study 3D models have been established using a panel of 16 ovarian cancer cell lines. Their main characteristics and the expression of EMT markers have been thoroughly described. These *in vitro* assays have confirmed the heterogeneity existing between the cell lines, bringing to light the importance of carefully selecting preclinical models attending to the objectives of each study. Thus, given the particular dissemination pathways of these tumors, the 3D models represent an alternative system for their study, especially regarding drug response. Our *in vitro* results show that SLC39A6 could be related with cisplatin resistance and relapse events.

These results must be taken with caution and further prospective validation with independent series, as well as *in vitro* functional studies, must be done in order to confirm their prognostic value.